

Lokalisation und Charakterisierung verschiedener antigener
Kohlenhydratepitope des Trematoden
Schistosoma mansoni

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
aus

Tobias Bausch
München

Gießen

2001

Aus der medizinischen Betriebseinheit
Biochemisches Institut

Leiter: Prof. Dr. K. Preissner
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Geyer

Gutachter: Prof. Dr. R. Friedrich

Tag der Disputation: 09. September 2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
1.1	Die Schistosomiasis (Bilharziose)..... 1
1.1.1	Anatomie 2
1.1.2	Krankheitsbild 4
1.1.3	Entwicklungszyklus 5
1.1.4	Diagnostik 6
1.1.5	Therapiemöglichkeiten..... 6
1.1.6	Vakzinierung 8
1.2	Glykokonjugate von <i>Schistosoma</i> 8
1.2.1	Le ^x bei <i>Schistosoma</i> 9
1.3	Problemstellung..... 10
2	Materialien und Methoden 11
2.1	Geräte 11
2.2	Materialien 11
2.2.1	Chemikalien 11
2.2.2	Antikörper 11
2.2.3	sonstige Materialien 12
2.3	Methoden..... 13
2.3.1	Infektion der Mäuse 13
2.3.2	Präparation der adulten Schistosomen 13
2.3.3	Aufbereitung der gewonnenen Würmer..... 14
2.3.4	Einbetten der Würmer für Gefrierschnitte 14
2.3.5	Herstellen der Gefrierschnitte 14
2.3.6	Färbung von Schnitten mittels Immunfluoreszenz 15
2.3.7	Färbung von Paraffinschnitten 16
2.3.8	Färbung von Schnitten mit AEC..... 16
2.3.9	Färbung von Schnitten mit APAAP 17
2.3.10	Synthese von Le ^x -Neoglycolipid..... 17
2.3.11	Le ^A -Neoglycolipidsynthese..... 19
2.3.12	ELISA 19
2.3.13	Dünnschichtchromatographie (HPTLC) 20
2.3.13.1	Färbung von Lipiden..... 21
2.3.13.2	Färbung von Kohlenhydraten..... 21
2.3.13.3	Immunfärbung..... 21
2.3.14	MALDI-TOF-MS..... 23
2.3.15	Bausteinanalyse von Neoglycolipiden 23
3	Ergebnisse 25
3.1	Das Le ^x -Epitop bei <i>S. mansoni</i> 25
3.1.1	Le ^x -Neoglycolipidsynthese..... 25
3.1.2	Neoglycolipidaufreinigung 26
3.1.3	MALDI-TOF-MS des Le ^x -Neoglycolipids 27

	3.1.4 Quantifizierung des Le ^X -Neoglycolipids durch Bausteinanalyse	28
	3.1.5 Synthese weiterer Neoglycolipide	28
	3.1.6 Anti-Le ^X -Immunassays.....	30
	3.1.7 Antikörperinhibitionsuntersuchungen	31
	3.1.8 Le ^X -Untersuchungen am adulten Wurm.....	33
	3.1.9 Le ^X -Untersuchung von Glycolipiden	35
	3.2 Untersuchungen mit weiteren Antikörpern	37
	3.2.1 Untersuchungen weiterer Antikörper im ELISA.....	37
	3.2.2 Untersuchungen weiterer Antikörper auf dem Gefrierschnitt	40
	3.2.3 Untersuchungen weiterer Antikörper mittels APAAP	44
	3.2.4 Untersuchungen weiterer Antikörper mittels HPTLC.....	45
	3.3. Untersuchungen auf Le ^A -Epitope	46
4	Diskussion	49
	4.1 Methodische Aspekte.....	49
	4.1.1 Gewinnung adulter Würmer	49
	4.1.2 Aufbereitung gewonnener Würmer	49
	4.2 Immunologische Aspekte	50
	4.2.1 Zuordnung zu Organsystemen.....	51
	4.2.2 Le ^X /Le ^A bei <i>S. mansoni</i>	52
	4.2.2.1 Bedeutung von Le ^X /Le ^A bezüglich Immunevasion	53
5	Zusammenfassung	54
6	Literatur	55

Abkürzungen:

α -Le ^X AK:	Anti – Le ^X Antikörper
<i>A. suum</i> :	<i>Ascaris suum</i>
AEC:	3-Amino-9-ethylcarbamazol
AP:	Alkalische Phosphatase
APAAP:	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
ASZW:	zwitterionische Fraktion der <i>A. suum</i> Glycolipide
ATT:	6-Aza-2-thiothymin
BSA:	bovine serum albumin
CAA:	circulating anodic antigen
CCA:	circulating cathodic antigen
C:M:	Chloroform / Methanol
C:M:W:	Chloroform / Methanol / Wasser
DABCO:	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DEPDA:	N,N'-Diethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
DHPE:	Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS:	foetal calf serum
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
G α R:	goat anti-rabbit
HDA:	Hexadecylanilin
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC:	high-performance liquid chromatography
HPTLC:	high-performance thin layer chromatography
HRP:	horseradish peroxidase; Meerrettich Peroxidase
IFT:	Immunfluoreszenztest
IMDM:	Iscove's modified Dulbecco's medium
LDN:	LacdiNAc
LDN-F:	fucosyliertes LacdiNAc
LDN-DF:	difucosyliertes LacdiNAc
Le ^X :	Lewis-X (Lacto-N-fucopentaose III)
Le ^A :	Lewis-A (Lacto-N-fucopentaose II)
mAK:	monoklonaler Antikörper
MALDI:	matrix-assisted laser desorption/ionisation
OS:	Oligosaccharid
PBS:	phosphat-buffered saline
RP:	„reverse-phase“
RT:	Raumtemperatur
R α M:	rabbit anti-mouse Antikörper
<i>S. mansoni</i> :	<i>Schistosoma mansoni</i>
TBS:	tris-buffered saline
TBS-B:	tris-buffered saline + BSA
TTBS-10:	tris-buffered saline 1:10 Verdünnung + BSA
TFA:	Trifluoressigsäure
TOF-MS	time of flight – mass spectrometry
Tween 20:	Polyoxymethylensorbitanmonolaurat

1. Einleitung

1.1 Die Schistosomiasis (Bilharziose)

Die Schistosomose (im Deutschen nach Ihrem Entdecker *Bilharz* auch Bilharziose genannt) ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Trematoden (Saugwürmer) der Gattung *Schistosoma* hervorgerufen wird. Zu den humanpathogenen Arten zählen *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* und *S. mekongi*, sie unterscheiden sich morphologisch, im Vorkommen und vor allem durch die klinischen Symptome, die sie hervorrufen. Allen gemein ist, daß sie auf warme Süßgewässer mit einer Temperatur von mind. 22 °C und auf das Vorkommen eines Zwischenwirtes (Süßwasserschnecken) angewiesen sind. Daraus folgt, daß die Erkrankung auf Länder beschränkt ist, in denen subtropisches bis tropisches Klima herrscht und ausreichend Süßgewässer vorhanden sind. Tabelle 1 zeigt dies noch etwas genauer.

Art	Region	Länder: herdförmige oder ausgedehnte Verbreitung
<i>S. haematobium</i>	Afrika Südwestasien	Ägypten, Libyen, Tunesien, Algerien, Marokko, West-, Zentral-, Ost- und Südafrika, Madagaskar, Mauritius Irak, Iran, Syrien, Saudi-Arabien, Jemen, Libanon, Türkei, Indien
<i>S. intercalatum</i>	Afrika	Gabun, Kamerun, Zentralafrikanische Republik, Tschad, Zaire, Tansania
<i>S. mansoni</i>	Afrika Südwestasien Zentral- und Südamerika	Ägypten, Libyen, West-, Zentral-, Ost-, Südafrika, Madagaskar Saudi-Arabien, Jemen, Oman, Karibische Inseln, Brasilien, Surinam, Venezuela
<i>S. japonicum</i>	Ostasien	Japan, Philippinen, China, Taiwan, Indonesien (Celebes)
<i>S. mekongi</i>	Südostasien	Thailand, Laos, Kamboscha, Malaysia**

** Artidentität unklar

Tabelle 1: Verbreitung der *Schistosoma*-Arten des Menschen (nach Kayser *et al.* in *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag)

Weltweit wird die Zahl der infizierten Menschen auf 200 (-300) Mio. geschätzt, es ist somit die zweithäufigste parasitäre Erkrankung nach der Malaria (mit ca. 500 Mio. infizierten Menschen pro Jahr).

1.1.1 Anatomie

Trematoden der Gattung *Schistosoma* sind zweigeschlechtige Parasiten mit einer Körperlänge zwischen 6 und 26 mm und einem Körperdurchmesser zwischen 0,25 und 1 mm. In der Regel liegt das kleinere, fadenförmige Weibchen in der Bauchfalte des größeren Männchens (\Rightarrow vgl. Abbildung 1). Die Arten der Schistosomen unterscheiden sich anatomisch im makro- und mikroskopischen Aufbau, durch den Aufbau ihrer Eier, durch die Lokalisation innerhalb des Wirtes und nicht zuletzt durch die Art des Zwischenwirtes. Die Einzelheiten sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
Körperlänge (mm)					
Männchen	7-15	11-14	6-10	7-20	10-18
Weibchen	9-20	13-24	7-15	10-26	14-20
Oberfläche	mit Wärzchen	mit Wärzchen	mit Wärzchen	ohne Wärzchen	ohne Wärzchen
Eier: Form	spindelförmig, mit Endstachel	spindelförmig, mit Endstachel*	spindelförmig, mit Seitenstachel	elliptisch, Seitenstachel winzig/fehlend	elliptisch, Seitenstachel winzig/fehlend
Länge (µm)	83-187	140-240	112-175	70-100	50-65
Hauptsitz der adulten Schistosomen	Venengeflecht des kleinen Beckens	Darm- und Mesenterialvenen	Darm- und Mesenterialvenen, Pfortader	Darm- und Mesenterialvenen, Pfortader	Darm- und Mesenterialvenen, Pfortader
Hauptorgane der Eiablageung	Blase, Ureter, Genitalorgane, Rektum	Darmwand	Darmwand und Leber	Darmwand und Leber	Darmwand und Leber
Eiauscheidung	im Harn, selten im Stuhl	im Stuhl	im Stuhl	im Stuhl	im Stuhl
Zwischenwirte (Schnecken)	<i>Bulinus spp.</i>	<i>Physops spp.</i>	<i>Biomphalaria spp.</i>	<i>Oncomelania spp.</i>	<i>Lithoglyphopsis (Tricula) spp.</i>
Erregerreservoir **	(Affen)	Wiederkäuer, Equiden	(Nagetiere, Affen)	Wiederkäuer, Hunde, Ratten	Hunde

* im Gegensatz zu *S. haematobium* nach „Ziehl-Neelsen“ anfärbbar

** in Klammern von untergeordneter Bedeutung

Tabelle 2: *Schistosoma*-Arten des Menschen (nach Kayser et al. in *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag)

Exemplarisch soll am Beispiel von *S. mansoni* das makro- und mikroskopische Bild im Folgenden gezeigt werden:

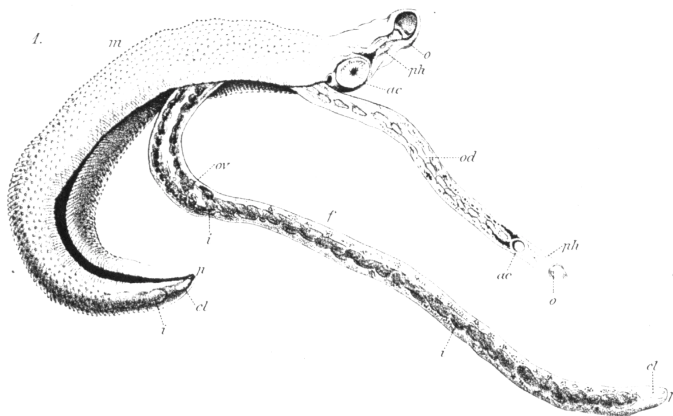


Abbildung 1: Makroskopische Anatomie von *S. mansoni* (nach Fritsch, in Archiv für mikroskopische Anatomie Bd. 31, 1888). Gezeigt sind in der Übersicht ein größerer, männlicher (äußerer) und ein kleinerer, weiblicher (partiell in der Bauchfalte liegender) Adultwurm.

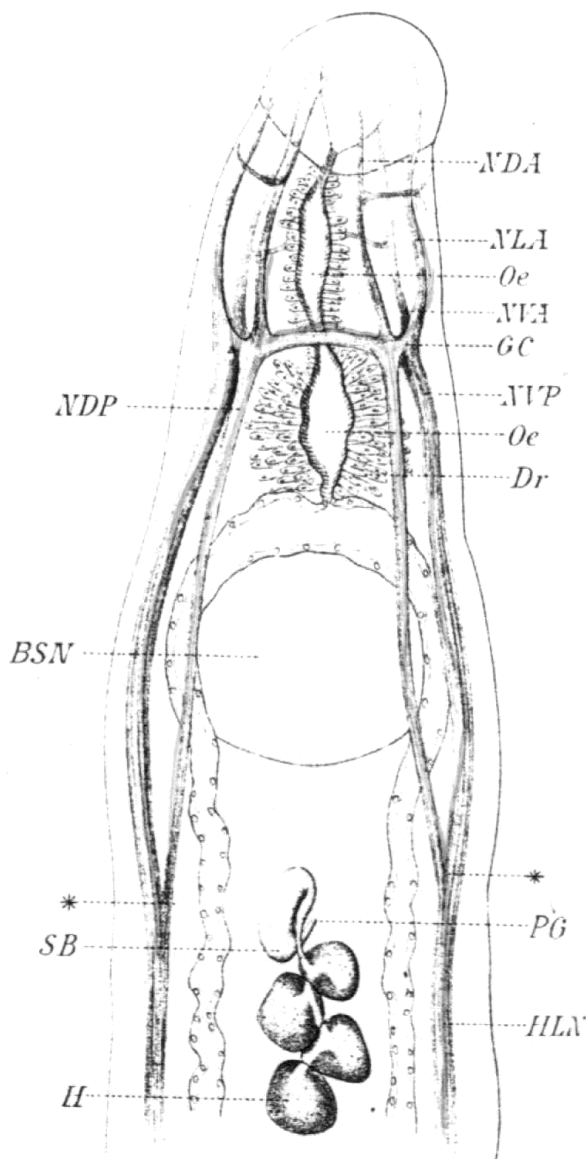


Abbildung 2: Mikroskopische Anatomie von *S. mansoni* (nach Loos, in Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, Bd. 46, Verlag Friedrich Cohen, Bonn, 1895). Gezeigt sind: NDA: vorderer Rückennerv, NLA: vorderer Seitennerv, Oe: Oesophagus, NVA: vorderer Bauchnerv, Gc: Kopfganglion, NVP: hinterer Bauchnerv, Dr: Drüsenzellen, PG: Porus genitalis, HLN: hinterer Längsnerv, NDP: hinterer Rückennerv, BSN: Bauchsaugnapf, SB: Samenblase, H: vorderes Hodenbläschen. Die mit einem * markierte Stelle zeigt die Verbindungsstelle der beiden hinteren Nerven.

1.1.2 Krankheitsbild

Aufgrund des Verlaufes der Erkrankung hat es sich als günstig erwiesen, die Infektion mit *Schistosoma* in 3 Phasen zu unterteilen (nach Kayser et al. in *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag)

1. die Penetrationsphase: das Eindringen der Cercarien durch die Haut führt zu einem örtlich und zeitlich auf wenige Tage begrenztem makulo-papulösem Exanthem mit Pruritus. Eine Sonderstellung nimmt in dieser Phase die Cercariendermatitis ein, die, ausgelöst durch nicht humanpathogene Cercarien, initial zu einer Sensibilisierung und bei späterem Kontakt zu einer allergischen Typ I Reaktion führen kann. Sie wird auch als „Badedermatitis“ oder „swimmer’s itch“ bezeichnet.
2. die akute Phase: ca. 3-10 Wochen *post infectionem* (in etwa zeitgleich mit dem Auftreten der ersten Eier) (1) treten Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Urtikaria, Bronchitis, abdominelle Schmerzen, Schwellung der lymphoretikulären Organe sowie im Blutbild eine Eosinophilie auf. Die klinischen Symptome persistieren einige Tage bis Wochen, in der Regel sind Eier im Stuhl bzw. im Harn zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar. Die auftretenden Symptome sind u. a. von der Infektionsdosis abhängig, somit kann diese Phase auch subklinisch verlaufen.
3. die chronische Phase: diese Phase ist durch die in den Organismus gelangten Eier bestimmt. Die vom Weibchen abgesonderten Eier penetrieren entweder direkt einzelne Organe (Darm, Harnblase) oder werden mit dem venösen Blutstrom davongetragen und bleiben in den kapillären Endstromgebieten (Leber, Lunge) liegen. Dort führen sie zu lokalen granulomatösen Inflammationen, die auch als „Pseudotuberkel“ bezeichnet werden. In den Granulomen kommt es zu einem Absterben der Eier innerhalb von ca. 3 Wochen und im Folgenden zu einem Umbau der Granulome, die zunehmend bindegewebig durchsetzt werden. Übrig bleibt ein fibrös-zirrhotischer Umbau des betroffenen Parenchyms.

Gerade bei Infektionen mit *S. mansoni* und *S. japonicum* steht in diesem Zusammenhang die Ausscheidung der Eier in den Portalkreislauf und somit die konsekutive Zirrhose der Leber im Vordergrund. Portale Hypertension mit allen Komplikationen (Ösophagusvarizen, -blutungen, Ascites, Leberversagen) sind die Folge. Bei Verlegung pulmonalarterieller Äste entsteht zunehmend eine Belastung des rechten Herzens mit Symptomen des „Cor Pulmonale“, das zu einer Rechtsherzdilatation und letztendlich zur Herzinsuffizienz führt.

An den direkt befallenen Organen kommt es ebenso zu den oben beschriebenen Veränderungen, die klinischen Symptome richten sich somit nach den betroffenen Organsystemen:

Bei Befall des Urogenitaltraktes steht die Makrohämaturie (vorwiegend der letzten Harnportion), die Pollakisurie sowie im Verlauf die durch Einengung der Ureteren/der Urethra bzw. durch Verkalkung der Blasenwand bedingte Hydronephrose. Veränderungen der Geschlechtsorgane sind ebenso möglich.

Bei der Schistosomose des Darmtraktes stehen je nach Lokalisation des Befalles enterokolitische Beschwerden im Vordergrund. Es kommt zu blutig-schleimigen Diarrhöen sowie zu einer makroskopisch sichtbaren Papillombildung der Darmschleimhaut.

1.1.3 Entwicklungszyklus

Im folgenden soll der Entwicklungszyklus der *Schistosoma* am Beispiel von *S. mansoni* dargestellt werden.

Die im Wirt lebenden adulten weiblichen Würmer produzieren Eier, in denen sich innerhalb weniger Tage Mirazidien entwickeln. Ein Teil der Eier erreicht das Darm/Blasenlumen, wo er ausgeschieden werden kann. Gelangen Exkremente in Süßgewässer schlüpfen nun die Mirazidien und infizieren die Wasserschnecken (\Rightarrow vgl. Tabelle 2). In den Schnecken findet eine Transformation der Mirazidien in Cercarien statt. Dabei geht aus der Mirazidie eine Muttersporozyste hervor, die sich zu Tochtorsporozysten weiterentwickelt. Am Ende des Transformationsprozesses steht die Cercarie, die 3 bis 6 Wochen *post infectionem* die Schnecke verläßt und im Wasser auszuschwärmen beginnt. Die mit einem gegabelten Ruderschwanz behafteten Cercarien schwimmen an der Wasseroberfläche und können sich zielgerichtet auf ein Stück Haut hinbewegen. Erreichen sie einen geeigneten Wirt, penetrieren sie binnen weniger Minuten dessen Haut und werfen dabei in der Regel ihren Schwanz ab. Sie durchwandern nun das subcutane Gewebe bis sie Anschluß an das Blut- oder Lymphgefäßsystem haben. Mit dem Blutstrom werden sie als *Schistosomula* davongetragen und erreichen so nach einer Herz- und Lungenpassage schließlich Pfortader und intrahepatische Gallengänge, wo sie zu adulten Würmern heranreifen. Kurz vor Erreichung der Geschlechtsreife vereinigen sich Männchen und Weibchen und migrieren dann gemeinsam in die Venengeflechte von Darm und Blase, wo sie sich mit

ihren Bauchsaugnäpfen festsaugen. Die Zeit vom Eindringen der Cercarie bis zum Nachweis von Eiern in Harn/Stuhl (Präpatenzzeit) dauert bei *S. mansoni* ca. 7-8 Wochen, bei *S. japonicum* und *S. intercalatum* 5-7 Wochen und bei *S. haematobium* 10-12 Wochen. Die durchschnittliche Überlebenszeit der Würmer im Endwirt liegt zwischen 2 und 5 Jahren, vereinzelt wurden aber schon 20-30 Jahre beobachtet.

1.1.4 Diagnostik

Neben der Klinik stehen zur speziellen Diagnostik zur Zeit mehrere Verfahren zur Verfügung. Dabei muß man unterscheiden, ob man möglichst sichere oder einfache/schnelle Ergebnisse haben möchte. Das sicherste Ergebnis kann nur durch einen direkten Nachweis der Eier bzw. der Würmer (beispielsweise als Biopsie eines Granulomes oder im Urin/Stuhl) erreicht werden. Jedoch ist diese Methode entweder invasiv (Biopsie) oder erst dann aussagekräftig, wenn Eier ausgeschieden werden (was nach der Erstinfektion mehrere Wochen dauert). Ein schnelleres und weniger invasives Verfahren bietet die serologische Diagnostik von zirkulierenden Antikörpern, die in verschiedenen Testverfahren (Komplementbindungsreaktion, indirekte Immunfluoreszenz, enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), Immunelektrophorese, Radioimmunoassay) nachgewiesen werden können (beispielsweise CCA (circulating cathodic antigen) und CAA (circulating anodic antigen) (2,3). Mit den gleichen Testverfahren können auch direkt zirkulierende Antigene detektiert werden (4-11).

1.1.5 Therapiemöglichkeiten

An erster Stelle soll hier die Prävention genannt werden. Aus dem Entwicklungszyklus der *Schistosoma* ergibt sich, daß eine ausreichende Aufklärung der Bevölkerung, sowie die Schaffung einer hygienischen Umgebung verbunden mit einer medizinischen Versorgung der Infizierten die Krankheit nahezu vollständig unter Kontrolle bringen kann. An erster Stelle steht dabei die Entsorgung von Stuhl und Urin. Schon die Errichtung einer Kloake („Plumpsklo“) würde den Kreislauf unterbrechen und zu einer Reduzierung der Mirazidien und somit der den Menschen infizierenden Cercarien

führen. Käme hinzu, daß Wasser für den täglichen Bedarf nicht mehr aus den Flüssen und Seen geholt werden würde, sondern dafür Brunnen oder eingefasste Wasserstellen geschaffen und benutzt würden, so hätte man die Reinfektion – auch durch nicht im Hauptwirt (Mensch) lebende Parasiten - ebenfalls ausreichend verhindert.

Ist ein Organismus von *Schistosoma* befallen, so gibt es eine Reihe von Anthelmintika, die eingesetzt werden können, um den Parasiten zu eliminieren. Tabelle 3 zeigt, welche Präparate zur Verfügung stehen sowie deren Wirksamkeit.

Präparat		Wirkung*		
Wirkstoff	Handelsname	<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>
Metrifonat	Bilarcil	+	-	-
Oxamniquin	Mansil, Vansil	-	+	-
Praziquantel	Biltricide	+	+	+

* + = wirksam, - = unwirksam

** Wirkung auf südamerikanische Stämme besser als auf afrikanische, in Südamerika sind aber auch Oxamniquin-restistente Stämme bekannt

Tabelle 3: Wirksamkeit verschiedener Anthelmintika auf *Schistosoma*-Arten (nach Kayser et al. in *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag)

Die (bislang meist durchgeführte) Bekämpfung des Zwischenwirtes (der Süßwasserschnecken) hat bislang keinen wesentlichen Rückgang der Infektionsrate bewirken können. Dies ist verständlich, da der Erreger über mehrere Jahre im Organismus persistiert und es somit immer wieder zu einer Kontamination des Wassers mit neuen Eiern kommt. Eine Sanierung auf nur diesem Wege könnte nur dann Erfolg haben, wenn die Bekämpfung der Schnecken so lange durchgeführt würde, bis keine neuen Miracidien (aufgrund von fehlendem Nachschub) mehr entstünden und somit eine Infektion des Menschen nicht mehr stattfände. In Verbindung mit einer Therapie der Menschen mit Anthelmintika wäre eine schnellere Sanierung theoretisch zu erreichen. Solange man die Schistosomiasis als ein lokales „Problem“ sieht, stimmt dies auch. Nun bewegen sich die Menschen aber von Ort zu Ort, es kommt immer wieder zu einem Ortswechsel bzw. zu einem Besuch der Nachbarschaft. Hierüber können – in ein bereits saniertes Gebiet – wieder neue *Schistosoma* eingeschleppt werden, der Kreislauf begäße von neuem.

Ebenso greifen die verwendeten Molluskiziden breitflächig in ein Ökosystem ein und bewirken Schäden, die sich wiederum auch auf den Menschen auswirken. Die ausgebrachten Substanzen schädigen – wenn auch in etwas geringerem Ausmaß – die

Fische. Die bekämpften Schnecken weiterhin stehen als Nahrungsgrundlage für Vögel nicht mehr zur Verfügung.

1.1.6 Vakzinierung

Da die Sanierung *Schistosoma* befallener Gebiete eine sehr große Aufgabe (sowohl finanziell als auch logistisch) darstellt, wäre eine suffiziente Vakzinierung, wie sie beispielsweise bei der Poliomyelitis oder anderen Erkrankungen durchgeführt wird, eine nicht nur finanziell günstigere Alternative zur immer wiederkehrenden Chemotherapie mit Anthelmintika. Es wurden eine Reihe von unterschiedlichen Kohlenhydratantigenen daraufhin untersucht, ob eine durch sie ausgelöste Immunantwort möglicherweise einen gewissen Schutz vor einer Reinfektion gewähren könnte. Eine ganze Reihe von unterschiedlichen Antigenen konnten hierbei eine partielle Immunität erzeugen, jedoch eine Reinfektion nicht ausreichend verhindern (12-14).

1.2 Glycokonjugate von *Schistosoma*

Um auch in Zukunft weitere Möglichkeiten der Chemotherapie zu haben, und gegebenenfalls einen neuen Ansatz zu einer wirksamen Vakzinierung zu bekommen, ist die Aufklärung biochemischer Eigenschaften und Synthesewege von Kohlenhydratantigenen essentiell. Indem man weiß, welche Bausteine für den Parasiten lebensnotwendig sind, kann man Wege finden, die ihm die Synthese dieser Bausteine unmöglich macht und er somit zugrunde geht. Des weiteren kann man erklären, weshalb es der menschliche Körper nicht schafft, den Parasiten eigenständig zu eliminieren.

1.2.1 Le^X bei *Schistosoma*

Bei *Schistosoma* wurden mehrere verschiedene Glykokonjugate beschrieben, die eine α 3-gebundene Fucose enthalten, darunter das Blutgruppen-Antigen Le^X (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-R) (15). Das Le^X-Epitop kommt sowohl beim Wirt als auch bei *S. mansoni* vor. Eine solch starke Ähnlichkeit von Wirts- und Parasitenantigenen wird mit dem Begriff „molecular mimicry“ umschrieben und kann einen Beitrag zur Immunevasion leisten (16,17). Obwohl Le^X ein körpereigenes Antigen ist, können hohe Anti-Le^X-Antikörpertiter erreicht werden (18). Das Le^X-Antigen wurde auf Glycolipiden von *S. mansoni* Cercarien (19-22), sowie auf Glycoproteinen verschiedener Stadien nachgewiesen (23). Die gegen Le^X gerichteten Antikörper im Infektionsserum gehören hauptsächlich zur IgM-Klasse (24), können aber auch der IgG-Klasse angehören (25). Der monoklonale Antikörper (mAK) 504B1 erkennt das Le^X-Epitop (26). Er bindet an sezerniertes Material an den Öffnungen der Acetabulardrüsen von Cercarien, markiert aber ansonsten die Oberfläche von Cercarien nicht und erkennt nicht deren Glycocalix (26). Innerhalb von 3 Stunden nach der Transformation (\Rightarrow vgl. 1.1.3) wird das Le^X-Epitop an der Oberfläche der Schistosomula exprimiert, jedoch nicht auf dem eventuell noch anhaftenden Cercarien-Schwanz (26). Nicht nur die Schistosomula bedecken sich beim Eindringen in den Säugetier-Wirt mit dem wirtseigenen Le^X-Epitop, sondern auch auf dem eindringenden Miracidium findet sich ein (allerdings anderes) Kohlenhydratepitop, das einem im Zwischenwirt vorhandenen gleicht (27). Auch hier findet also ein „molecular mimicry“ statt. Das Le^X-Epitop findet sich auch an der Oberfläche und im Darmepithel des adulten Wurmes. Der anti-Le^X IgM mAK E.5 erkennt ein Glycoprotein mit einer apparenten Molekülmasse von 200 kDa an der Oberfläche von adulten *Schistosoma* (15). Auf Miracidien konnten Le^X-Epitope nicht nachgewiesen werden.

Beim Menschen kommt Le^X auf Granulozyten vor, wo es für Autoantikörper zugänglich sein sollte (28). Weiterhin findet es sich im Gehirn, dem Verdauungstrakt und den distalen Tubuli der Nieren (28). Anti-Le^X Antikörper können bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie die Neutrophilenzahl erniedrigen, sind aber ansonsten kaum toxisch (15). Für Granulozyten wird eine antikörperabhängige, komplementvermittelte Lyse durch die anti-Le^X Antikörper postuliert (29).

Inwieweit Le^X-Antigene für die Vakzinierung eingesetzt werden können, ist unklar, da es zu einer Autoimmunantwort kommen kann (15,26,30). Vakzinierungsexperimente

mit attenuierten Cercarien deuten darauf hin, daß anti-Le^X-Antikörper eine protektive Rolle haben könnten (24). Der mAK E.5 und andere Antikörper, die gegen Le^X gerichtet sind, schützen Mäuse bei passiven Übertragungsexperimenten gegen Schistosomiasis (15,24,31-33). Weiterhin vermitteln Antikörper gegen Le^X *in vitro* die Tötung von Schistosomula durch Effektorzellen (15). Le^X-tragende Oligosaccharide (OS) lassen B-Zellen proliferieren und verschiedene Interleukine (Interleukin 10 und Prostaglandin E2) sezernieren. Es kommt dadurch zu einer Herunterregulierung der Th-1 vermittelten Immunantwort und einem Überwiegen der Th-2 vermittelten Immunantwort (34-36).

Insgesamt scheinen die Le^X-Glykokonjugate von *Schistosoma* bei vielen essentiellen Schritten im Lebenszyklus des Parasiten eine Rolle zu spielen. Ein Beispiel ist hier die Wanderung des Parasiten im Säugetierwirt (24). Auf Eiern vorkommendes Le^X-Antigen scheint für die Anhaftung am Endothel wichtig zu sein (37).

1.3 Problemstellung

Glycoepitope gelten sowohl funktionell als auch morphologisch als wichtige Bestandteile des Parasiten. Sie haben bislang nur einen festen Stellenwert im Bereich der Serodiagnostik einer Schistosomiasis, die bislang schon erfolgte Aufklärung der Synthesewege und das Vorkommen der Glycoepitope haben neue Ansätze im Bereich der Therapie und Vakzinierung gesetzt. Auch im Bereich der Immunologie haben die durch den Wurm exprimierten Glycoantigene eine Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden, verschiedene antigene Glycoepitope auf dem Wurm nachzuweisen, sie morphologisch zuzuordnen, bezüglich ihrer Eigenschaften zu charakterisieren und bezüglich ihrer Rolle im Immunsystem des Wirtes zu interpretieren.

2. Materialien und Methoden

2.1. Geräte

Druckpumpe

Brutschrank 37°C, 5% CO₂

Einschweißgerät zum Zuschweißen von Plastikgefrierbeuteln

Kryostat, Fa. Jung (Jung Frigocut 2800E; Messer Fa. Leica, C-Messer)

Immunfluoreszenzmikroskop Fa. Zeiss / Fa. Leica (Zeiss Axiolab)

Schüttelgerät „The belly dancer“, Fa. Stovall life science, USA

Lichtmikroskop, Zeiss Axiolab, Fa. Zeiss,

ELISA-Lesegerät, Fa. BioRad

DC-Mat, Fa. Baron, Reichenau

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Alle aufgeführten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in höchster Reinheitsstufe von den Firmen Behringwerke (Marburg), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

flüssiger Stickstoff, Fa. Linde, Höllriegelskreuth, Reinheitsgrad 4.6

Lacto-N-fucopentaose III (Lewis-X Pentasaccharid [Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc]), Fa. Dextra, Reading, UK

Lacto-N-fucopentaose II (Lewis-A Pentasaccharid [Gal(β1-4)[Fuc(α1-4)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc]), Fa. Dextra, Reading, UK

2.2.2 Antikörper

Die Antikörperkonjugate wurden von den Firmen Dako (Hamburg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Primärantikörper wurden durch Herrn Dr. Q. Bickle, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, Herrn Dr. M. Doenhoff, University of North Wales, Bangor, UK und Herrn Dr. D. Dunne, University of Cambridge, UK zur Verfügung gestellt.

Dr. Q. Bickle: G8G12(*Bickle 1*)

NAF (negative ascites fluid from non-hybrid myeloma cells) (Negativ Kontrolle; Aszites von nicht-hybriden Myelomzellen) (*Bickle 2*)

C1C7 (*Bickle 3*) (ein anderer Clon des mAK C1C9 [*Bickle 8*])

G11 (*Bickle 4*)

B3A7 (*Bickle 5*)

H3H1 (*Bickle 6*)

Sm1.7 (*Bickle 7*)

C1C9 (*Bickle 8*)

M2D3H bzw. Sm2.43.8 (*Bickle 9*)

Dr. D. Dunne: 4B12P1 (anti-alpha-1 [NSO 24]) (*Dunne 1*)
 4B9F4 (anti-alpha-1 [NSO 24]) (*Dunne 2*)
 1FSB (anti-alpha-1 [NSO 24]) (*Dunne 3*)
 SM1.7 (3) (anti-K3 IgM; *Dunne 4*)
 B7B3 (anti-K3 IgM; *Dunne 5*)
 362A10 (anti-K3 IgM; *Dunne 6*)
 C1C9 (ascites; anti-K3 IgG 3; *Dunne 7*) (Entspricht den mAK *Bickle 3* und 8)

Dr. M. Doenhoff: murines chronisches *S. mansoni* Infektionsserum (CIS)
 Kaninchen Hyperimmunseren

Fa. Sigma, Deisenhofen: α -Le^X-mAK(4D1), α -Le^A-mAK

2.2.3 Sonstige Materialien

NMRI-Mäuse
 Cercarien
S. mansoni infizierte Mäuse
 frische Würmer
 Objektträger sechsfelderig, azetonbeständig, Fa. Medco, München
 Deckgläschen Fa. IDL, 24 x 50 mm
 Glaskasten mit Gestell für Objektträger
 Präparierbesteck, fein (Pinzette, Nadel, kleines Skalpell, feine Schere)
 Eingefrorene *S. mansoni* Würmer
 Metallring 1,5 cm Durchmesser, 0,5 cm hoch
 feuchte Kammer (30 cm x 20 cm)
 Polysorb ELISA-Platte, Fa. NUNC, Wiesbaden (für Lipide)
 Maxisorb ELISA-Platte, Fa. NUNC, Wiesbaden (für Proteine und Peptide)
 Einbettmedium *Tissue-Tek*, Fa. Plano, Wetzlar
 Normalphasenkieselgelkartusche
 Waters-Kartusche, 1 g (SepPak)
 Hamilton-Spritze
 Kieselgel-60-Platte für HPTLC, Fa. Merck

2.3 Methoden

2.3.1 Infektion der Mäuse

Zur Infektion mit *Schistosoma mansoni* wurden NMRI-Mäuse mit Pentobarbital (5 µl/g Körpergewicht) betäubt. Nach Fixierung auf dem Rücken mittels Klebeband wurde ihnen das Bauchfell abrasiert, ein Metallring (1,5 cm Durchmesser, 0,5 cm hoch) auf die rasierte Stelle gelegt und dieser ebenfalls mit Klebeband fixiert. In den Metallring wurden die in Flüssigkeit befindlichen Cercarien gegeben. Je nach gewünschtem Infektionsgrad wurden zwischen 50 und 200 Cercarien verwendet. Das Eindringen der Cercarien nahm etwa 30-60 Minuten in Anspruch, dabei war darauf zu achten, daß die Mäuse nicht auskühlten (Wärmeerhalt mittels Infrarotlampe). Nach 3-5 Monaten wurden die Adultwürmer gewonnen (⇒s. 2.3.2).

Verwendete Materialien: Pentobarbital 25 mg/ml

2.3.2 Präparation der adulten Schistosomen

Die infizierten Mäuse wurden durch peritoneale Injektion mit Pentobarbital betäubt (⇒s. 2.3.1) und dann präpariert. Dazu legte man sie auf den Rücken, streckte die Extremitäten aus, fixierte sie mittels Klebebandstreifen und durchtrennte ihnen mit einem Y-Schnitt die Bauchdecke. Die Pfortader wurde nun durchtrennt, gleichzeitig wurde durch ventrikuläre Punktion eine kardiale Perfusion von Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA) mittels Druckpumpe eingeleitet, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Die Schistosomen wurden dann durch die durchtrennte Pfortader ausgeschwemmt und in einer Wanne aufgefangen. Einzelne in der Auffangwanne befindliche Schistosomen wurden mit einem Haarpinsel vorsichtig manuell aufgenommen. Die gewonnenen Schistosomen wurden in eine Petrischale gegeben, dabei war ein Austrocknen der Würmer durch Zugabe von Kulturmedium zu verhindern.

Verwendete Materialien: Na-EDTA 3%,

Kulturmedium: Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)
foetal calf serum (FCS) 10%
Penicillin 100 i.E./ml, Streptomycin (100 mg/ml)
2 mM Glutamax, 25 mM (HEPES) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure

2.3.3 Aufbereitung der gewonnenen Würmer

Die gewonnenen Würmer sollten in IMDM für 24 h im Brutschrank aufbewahrt werden, damit eine möglichst vollständige Entleerung des Darminhaltes (Leuko- und Erythrozyten) der Würmer stattfinden kann. Das weitere Vorgehen richtete sich nach den geplanten Experimenten. Bei allen morphologischen Untersuchungen wurden die Würmer frisch verwendet (Einbetten frisch gewonnener Adultwürmer, \Rightarrow s. 2.3.4), um das native Bild zu bewahren. Waren chemische Untersuchungen vorgesehen, so konnten verschiedene Aufbewahrungsverfahren (wie z.B. Lyophilisierung, Einbetten in Glycerin, Einlegen in Alkohol, etc.) angewendet werden.

2.3.4 Einbetten der Schistosomen zum Herstellen von Gefrierschnitten

Die Würmer wurden aus dem Kulturmedium genommen und auf Filterpapier abgetupft. Nun wurden sie auf einen Objektträger gelegt und möglichst parallel zur Seitenkante ausgerichtet, danach erfolgte Überschichtung mit Einbettmedium und Auflegen eines zweiten Objektträgers. Dieses Konstrukt wurde nun in flüssigem Stickstoff bis zur Aushärtung des Einbettmediums gekühlt, die Schistosomen sollten nun parallel angeordnet und eingefroren sein (besonders wichtig für morphologische Studien). Nun wurden die beiden Objektträger voneinander getrennt, das Einbettmedium mit den Würmern mit einer Rasierklinge abgeschnitten und gleich weiterverarbeitet (taut schnell wieder auf). Zum Lagern wurden die Würmer nochmals mit Einbettmedium umschichtet und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Danach wurde der so gewonnene Block mit Alufolie umwickelt, in Plastikfolie eingeschweißt und bei -20°C eingefroren. Die Lagerung bei -20°C war für ca. 1 Jahr möglich.

Verwendete Materialien: Einbettmedium *Tissue Tek* Fa. Plano, Wetzlar;

2.3.5. Herstellen der Gefrierschnitte (Quer- und Längsschnitte)

Auf den Objekthalter des Kryostaten wurden die eingefrorenen Würmer aufgebracht, nochmals mit Einbettmedium überschichtet und dann geschnitten. Dazu empfahl es sich, zunächst mit einer großen Schnittdicke ($>20\text{ }\mu\text{m}$) anzufangen, bis man in den

Bereich des Präparates gekommen war. Nun wurden feine Schnitte mit einer Schnittdicke von 5-7 μm angefertigt. Die einzelnen Schnitte mußten schnell auf Objektträger aufgezogen werden (es empfahl sich, mehrfelderige, azetonfeste Objektträger zu verwenden). Die fertigen Objektträger wurden nun 24 h bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, danach mußte man sie entweder lagern oder weiterverwenden. Zum Lagern wurden sie in Alufolie eingeschlagen, in Plastik eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt (Haltbarkeit ca. 6 Monate).

2.3.6 Färbung von Gefrierschnitten mittels Immunfluoreszenz

Verwendete man bereits auf Objektträger aufgezogene, eingefrorene Gefrierschnitte, mußte man sie vor der Fixierung zunächst auf RT erwärmen. Verwendete man frisch hergestellte Gefrierschnitte, so konnte sofort mit der Fixierung begonnen werden. Die Fixierung erfolgte in kaltem (-10°C) Azeton für 7-10 Minuten. Nach anschließender Lufttrocknung wurde in der vorbereiteten Feuchtkammer der erste Antikörper aufgegeben (Verdünnungen variierten zwischen 1:20 und 1:1000). Jeder Schnitt mußte vollständig mit Flüssigkeit überschichtet sein, bei Verwendung von sechsfelderigen Objektträgern war eine Flüssigkeitsmenge von 30 μl pro Feld ausreichend. Die Objektträger mit dem Erstantikörper wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie dreimal in „phosphate-buffered saline“ (PBS) für je 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen, danach mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Zweitantikörper überschichtet und in der feuchten Kammer 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Dem Zweitantikörper, der in PBS verdünnt wurde (Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:50), wurde 0.5% *Evans Blue* zugesetzt. Bei der Inkubation war darauf zu achten, daß kein Licht auf die Schnitte dringen konnte, um ein Verblassen der Zweitantikörper zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Objektträger wie oben beschrieben gewaschen und anschließend im handwarmen Luftstrom getrocknet.

Zum Mikroskopieren wurden die Objektträger mit Glyzerinpuffer überschichtet, mit einem Deckgläschen abgedeckt und im Immunfluoreszenzmikroskop (Quecksilberdampflampe) betrachtet und ggf. photographiert. Es empfahl sich, Filme mit mindestens 400 ASA zu nehmen.

2.3.9 Färbung von Schnitten mit APAAP (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase)

Die präparativen Vorbereitungen der Objektträger erfolgten nach oben beschriebenem Verfahren (\Rightarrow s. 2.3.6, 2.3.7), ebenso die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Nun wurde ein gegen den Erstantikörper gerichteter Brückenantikörper aufgebracht, der bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert wurde. Als Drittantikörper wurde nun ein mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter Antikörper eingesetzt, dieser bindet an Epitope des Brückenantikörper. Als Färbereagenz diente ein Phosphorsäureester, der durch die Phosphatase gespalten wurde (38).

Um die entstandene rote Färbung vom unspezifischen Hintergrund abgrenzen zu können, wurde mit Methylenblau eine Minute lang gegengefärbt.

Verwendete Materialien: APAAP-Färb- und Antikörperkit Fa. Sigma, AP-konjugierter Drittantikörper, Methylenblau 1g/1000 ml H₂O

2.3.10 Synthese von Le^x – Neoglycolipid

Um Vergleiche zwischen bekannten und unbekannten Epitopen ziehen zu können, mußten letztere an chemisch gleichartige Strukturen gebunden werden, um möglichst nahe am natürlichen Zustand zu sein. Daher war es notwendig, sogenannte Neoglycolipide durch reduktive Aminierung zu synthetisieren.

Das OS wurde zunächst in Aqua dest. gelöst (10 mg/ml) und in ein Microröhrchen überführt. Jetzt wurde das DHPE (Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin, 5 mg/ml), gelöst in Chloroform und Methanol (C:M; 1:1; v/v), hinzugegeben, wobei ein molares Verhältnis von DHPE zu OS größer 8:1 einzuhalten war. Bei 60°C und unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades lösten sich die Substanzen. Die Lösung wurde nun eine Stunde lang bei 60°C inkubiert, danach mit in Methanol gelöstem Natriumcyanoborhydrid (10 mg/ml) gemischt (molares Verhältnis NaBH₃CN : DHPE 1:2) und weitere 16 Stunden bei 60°C inkubiert. Um festzustellen, ob überhaupt eine Reaktion stattgefunden hat, wurde eine Dünnschichtchromatographie (HPTLC) durchgeführt, in der freies OS, DHPE und ein Reaktionsprodukt zu sehen sein sollten (\Rightarrow s. 2.3.13 und Unterpunkte). Das Reaktionsgemisch wurde nun durch Normalphasenchromatographie mit einer Waters-SepPak-Kartusche aufgetrennt. Dazu

wurde das Reaktionsgemisch im Stickstoffluftstrom getrocknet, in 5 ml C:M 80:20 (v/v) aufgenommen, gegebenenfalls mit Ultraschall gelöst und dann auf die Normalphasenkieselgelsäule aufgebracht. Das Probenröhrchen wurde nochmals mit 5 ml C:M 80/20 (v/v) ausgespült, die Flüssigkeit wiederum auf die Säule gebracht und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wurde nach unten stehendem Schema (\Rightarrow s. Tabelle 4) eluiert, bei einem Wechsel der Lösungsmittel wurde ebenfalls jeweils ein neues Auffangröhrchen untergestellt.

Fraktion	Chloroform	Methanol	Wasser	Menge
1	80	20	0	2 mal 5 ml
2	70	30	0	10 ml
3	60	40	0	10 ml
4	50	50	0	10 ml
5	65	25	4	10 ml
6	30	60	8	10 ml
7	10	70	2	10 ml

Tabelle 4: Lösungsmittelzusammenstellung zur Trennung von Le^{X} -Neoglycolipid

Die angegebenen Zahlen sind Verhältniszahlen.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden wiederum durch Dünnschichtchromatographie (\Rightarrow s. 2.3.13) untersucht und von den Fraktionen, die das Reaktionsprodukt enthielten, wurde eine MALDI-TOF-MS Analyse (\Rightarrow s. 2.3.14) durchgeführt und das Reaktionsprodukt dadurch charakterisiert.

Es war ebenso möglich, anstelle des DHPE auch HDA (Hexadecylanilin) zu verwenden. Die Synthese und auch die Aufreinigung am Ende waren analog zur Umsetzung mit DHPE. Auch hier wurde der Erfolg der Synthese durch MALDI-TOF-MS überprüft.

Verwendete Materialien: Lewis-X-Pentasaccharid (Le^{X} -OS), Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin (DHPE), Hexadecylanilin (HDA), Chloroform, Methanol, Aqua dest., Natriumcyanoborhydrid, Normalphasenkieselgelkartusche (Fa. Millipore, Eschborn),

2.3.11 Synthese von Le^A-Neoglycolipid

Die Synthese des Le^A-Neoglycolipids erfolgte analog zur Synthese des Le^X-Neoglycolipids. Als Ausgangssubstanz diente das Le^A-OS, die Syntheseschritte und die nachfolgenden Aufreinigung verliefen analog zur Le^X-Neoglycolipidsynthese. (⇒s. 2.3.10, 2.3.14)

2.3.12 Untersuchungen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Auf eine Polysorbplatte der Firma NUNC wurde in Propanol oder Ethanol gelöstes Glycolipid gegeben und die Platte bei 37°C vollständig getrocknet. Jetzt wurde die Platte zweimal mit jeweils 250 µl TBS gewaschen, die restliche Flüssigkeit abgeklopft und dann mit 250 µl TBS-B für eine Stunde bei 37°C blockiert. Nach dem Blockieren wurde die Platte mit 250 µl TTBS-10 zweimal gewaschen, die restliche Flüssigkeit wiederum abgeklopft und dann mit 100 µl vom ersten Antikörper, verdünnt in TTBS-10-B, bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation wurde mit fünfmaligem Waschen mit je 250 µl TTBS-10 beendet. Der mit HRP konjugierte Zweitantikörper, der sich gegen den ersten Antikörper richtet, wurde ebenfalls in TTBS-10-B verdünnt und nach dem Abklopfen so aufgegeben, daß pro Vertiefung 100 µl vorhanden sind. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde wieder fünfmal mit TTBS-10 gewaschen und nach dem letzten Abklopfen 100 µl des Färbesubstrates aufgebracht. Das Abstoppen mit 100 µl der Stopplösung, die einfach zu dem in den Vertiefungen befindlichen Substrat hinzupipettiert wurde, erfolgte in gleicher Reihenfolge wie das Aufbringen des Substrates. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

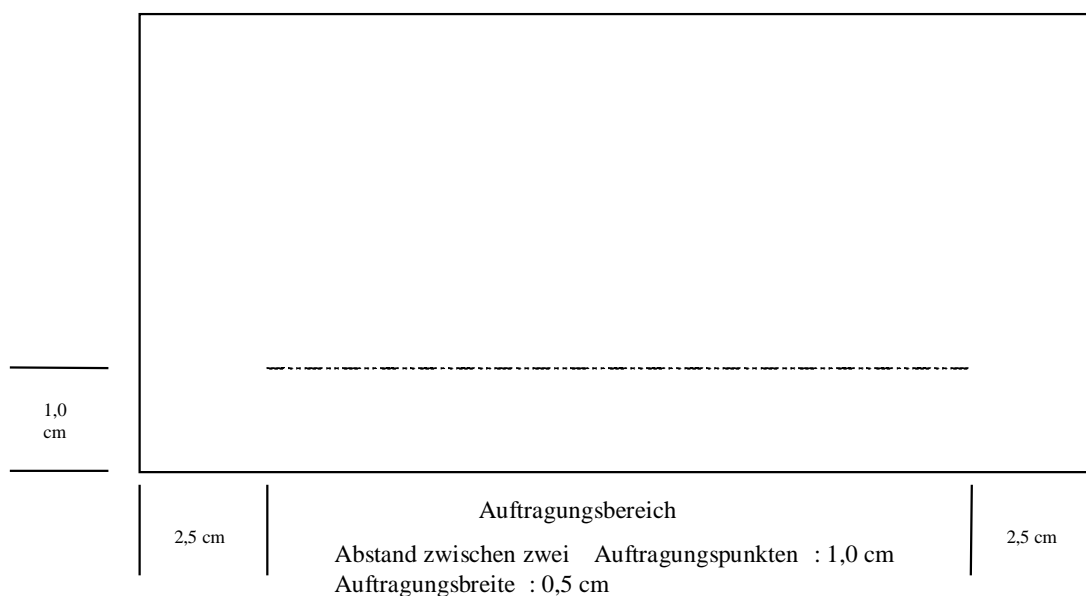
Verwendete Materialien:

TBS Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl
TBS-B Puffer:	TBS 0,5% (w/ v) bovine serum albumin (BSA)
TTBS-10 Puffer:	TBS, 1:10 verdünnt 0,05% Polyoxymethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)

TTBS-10-B Puffer:	TTBS-10 0,25% (w/v) BSA
Färbesubstrat:	100 mM Citratpuffer, pH 6,0 1 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin 4,41 mM H ₂ O ₂
Stopplösung:	12,5% H ₂ SO ₄ (7,0 ml H ₂ SO ₄ konz. ad 100 ml H ₂ O)
Citratpuffer:	21,04 g Zitronensäure-Monohydrat 900 ml H ₂ O bidest. mit NaOH auf pH 6,0 einstellen ad 1,0 l H ₂ O bidest.

2.3.13 Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Auf eine Kieselgel-60-Platte (Merck) wurden zunächst mit einem weichen Bleistift Markierungen gezeichnet, auf die dann mit einer Hamilton-Micro-Spritze die zu trennenden Substanzen aufgetragen wurden (siehe Zeichnung). Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde die Spritze nach jedem Auftrag fünfmal mit Methanol durchgespült.



Die durch Luftstrom getrocknete Platte wurde nun in den HPTLC-Mat (Baron, Reichenau) gehängt und 24 ml des Laufmittels in den Laufmittelbehälter gefüllt. Das in der Kammer befindliche Filterpapier, das zur besseren Äquilibration dient, wurde ebenfalls mit einigen Millilitern des Lösungsmittels getränkt. Nach der automatischen Entwicklung der Platte wurde sie entnommen, trockengeföhnt und konnte nun verschiedenen Färbeverfahren zugeführt werden.

2.3.13.1 Färbung von Lipiden

Um die bei der Dünnschichtchromatographie getrennten Substanzen sichtbar machen zu können, gibt es eine Reihe von verschiedenen Verfahren. Die Jodkammer diente dazu, Lipide nachzuweisen. Die Platte wurde dazu in ein Becherglas gestellt, in dem sich elementares Jod befand. Nach 10 bis 20 Minuten konnte man an den Stellen, an denen sich auf der Platte Lipide befanden, einen gelben Fleck sehen.

2.3.13.2 Färbung von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate wurden auf einer Kieselgel–Dünnschicht–Platte mittels der Orcinol-Schwefelsäurefärbung nachgewiesen. Die Platte wurde dazu mit Orcinollösung vernebelt und dann im Ofen unter visueller Kontrolle bei 110°C etwa 5 bis 15 Minuten inkubiert. An den Stellen, an denen sich Kohlenhydrate befanden, wurde eine violett-braune Bande sichtbar.

Verwendete Materialien:

Orcinollösung: 0,2 g Orcinol in 100 ml 2 M H_2SO_4

2.3.13.3 Immunfärbung

Ob es sich bei den Banden, die in den beiden oben gezeigten Verfahren sichtbar gemacht werden konnten, um antigene Komponenten handelte, wurde mittels der Immunfärbung getestet (39) (40). Entweder war bekannt, welche Struktur von dem Antikörper erkannt wird, oder es wurde getestet, ob ein Antikörper überhaupt eine Struktur erkennt, in beiden Fällen war das Verfahren gleich, lediglich die Aussage, die

man daraus ziehen konnte, war eine andere. Die Platte wurde nach der Chromatographie unter dem Fön getrocknet und dann für eine Minute in Plexigum getaucht. Nach erneutem Trockenfönen wurde sie in PBST-BSA eine Stunde lang blockiert. Der zu testende Antikörper wurde in PBST-BSA verdünnt (zwischen 1:20 und 1:250) und nach dem Blockieren auf die abdekantierte, aber noch feuchte Platte aufgegeben. Für eine 10 cm mal 10 cm große Platte benötigte man in etwa 3 bis 4 ml. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über 2 Stunden bei RT. Nach 6 bis 8 maligem Waschen mit jeweils 10 ml PBST wurde der zwischen 1 : 500 und 1 : 5000 verdünnte HRP-konjugierte Zweitantikörper, der sich gegen Strukturen des Erstantikörpers richten muß, auf die Platte aufgetragen. Auch diese Inkubation wurde über 2 Stunden bei RT durchgeführt. Danach wurde dreimal mit je 10 ml PBS, einmal mit 10 ml Citratpuffer gewaschen und dann die Färbelösung aufgegeben (41). Da die Färbezeit recht unterschiedlich war, wurde so lange gewartet, bis ein ausgewogenes Verhältnis von Hintergrund zu spezifisch Angefärbtem entstanden war. Um die Färbung abzustoppen, wurde die Platte 6 bis 8 mal mit je 10 ml PBS gewaschen. An den Stellen, an denen der Erstantikörper gebunden hat, war eine blaue Bande zu sehen.

Verwendete Materialien: Plexigum-Lösung (0,5% Plexigum, [Röhm GMBH, Deutschland] in n-Hexan : CHCl_3 , 9:1;

PBS (\Rightarrow s. 2.3.6); Citratpuffer (\Rightarrow s. 2.3.12),

PBST: PBS

0,05% Tween 20

PBST-BSA: PBST + 2% (w/v) BSA

Färbestammlösung: 97,5 mg 4-Chloro-1-naphthol

60 mg Diethylphenylendiamin (DEPDA)

10 ml Acetonitril, gut lösen, Lagerung bei -20°C

Färbelösung: 240 μl Färbestammlösung

10 ml Citratpuffer

8 μl Perhydrol in 30% H_2O_2

2.3.14 Untersuchungen mit MALDI-TOF-MS

Zur Bestimmung der Masse eines Moleküls mittels matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) wurde dieses auf ein sogenanntes Target aufgebracht. Das Target wurde zunächst mit einer Matrix (6-Aza-2-thiothymin [ATT]) (42-44) beschichtet. Dann wurde das zu messende Reagenz punktförmig auf die Matrix aufgebracht, im Luftstrom getrocknet und wiederum mit Matrix überschichtet. Um eine externe Massenkalisierung vorzunehmen, wurde ein Punkt Angiotensin, eingebettet in Matrix, ebenfalls auf dieses Target mit aufgebracht. Nun wurde das Target in ein Hochvakuum eingeschleust und mittels eines Stickstofflasers (337 nm) beschossen.

Die sowohl im Linear- als auch im Reflektormodus erzeugten Einzelspektren wurden aufsummiert (bis zu 100 Einzelspektren), die Gipfel herausgegriffen und beschriftet.

Verwendete Materialien: 6-Aza-2-thiothymin, Massenspektrometer „Vision 2000“ (Finnigan/MAT, Bremen)

2.3.15 Bausteinanalyse von Neoglycolipiden mittels reduktiver Aminierung mit Anthranilsäure

Die Proben wurden mit 100 µl 4 M Trifluoressigsäure (TFA) versetzt, 1 Minute mit Ultraschall behandelt und 4 h bei 100°C inkubiert. Die TFA-Lösung wurde danach im Stickstoffstrom abgeblasen, die trockenen Proben in je 10 µl 0,6%iger Natriumacetat-Lösung aufgenommen, mit 50 µl frisch angesetztem Derivatisierungsreagenz (s.u.) versetzt, 1 Minute mit Ultraschall behandelt und 45 Minuten bei 80°C inkubiert.

Die Ansätze wurden nun mit 60 µl Laufmittel A auf 120 µl aufgefüllt. Die Anthranilsäurederivate wurden durch RP-HPLC (reverse-phase high-performance liquid chromatography) getrennt. Hierzu verwendete man eine Superspher C18_{ec} RP-Säule (4 µm Partikelgröße, 4x250 mm; Merck) bei RT und einen Fluß von 1 ml/min unter Einsatz eines Gradienten (⇒s. Tabelle 5). Die fluoreszenzphotometrische Detektion erfolgte bei 425 nm (Anregungswellenlänge: 360 nm).

Verwendete Materialien:

Derivatisierungseragenz: Anthranilsäure 6 mg/ml

Natriumcyanoborhydrid 20 mg/ml

in Methanol mit 4% Natriumacetat, 2% Borsäure

Laufmittel A: 0,3% 1-Butylamin, 0,5% Phosphorsäure, 1% Tetrahydrofuran (v/v) in H₂O

Laufmittel B: Laufmittel A/Acetonitril 50:50 (v/v)

<u>t/min</u>	<u>% Laufmittel A</u>	<u>%Laufmittel B</u>
0	95	5
7	95	5
25	82	18
26	0	100
31	0	100
32	95	5
45	95	5

Tabelle 5: Gradient zur Trennung von Monosaccharid-Anthranilsäure-derivaten

3. Ergebnisse

3.1 Das Le^X-Epitop bei *S. mansoni*

Die Lokalisation von verschiedenen antigenen Strukturen *in situ* ist mit chemischen Untersuchungen über die Eigenschaft dieser Strukturen gekoppelt worden. Bevor aber Untersuchungen am Wurm direkt angestellt werden konnten, war eine nähere Charakterisierung der Antikörper durch andere Untersuchungstechniken unerlässlich. Aus den Ergebnissen mit insgesamt 18 monoklonalen und 19 polyklonalen Antikörpern wurden einige ausgewählt, um mit diesen weitere Untersuchungen anstellen zu können.

3.1.1 Le^X-Neoglycolipidsynthese

Der von Q. Bickle zur Verfügung gestellte mAK G8G12 (*Bickle 1*) wurde zuerst näher untersucht. Erste HPTLC-Immunfärbungen von *S. mansoni* Glycolipiden deuteten darauf hin, daß der mAK G8G12 das Le^X-Epitop erkennt (\Rightarrow s. 3.1.6). Um sein Bindungsverhalten bei Glycolipiden von *S. mansoni* möglichst klar darstellen zu können und um eine Positivkontrolle zu haben, wurde zunächst ein Le^X-Neoglycolipid synthetisiert (\Rightarrow s. 2.3.10). Abbildung 3 zeigt die HPTLC des Gesamtpools nach reduktiver Aminierung und Orcinol-Schwefelsäurefärbung.

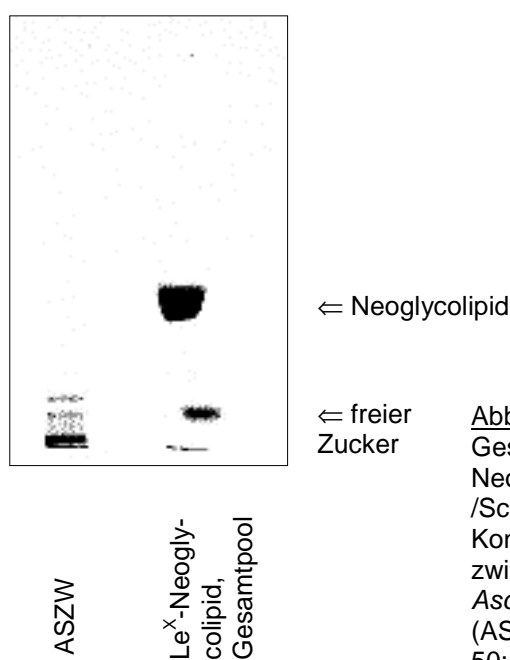


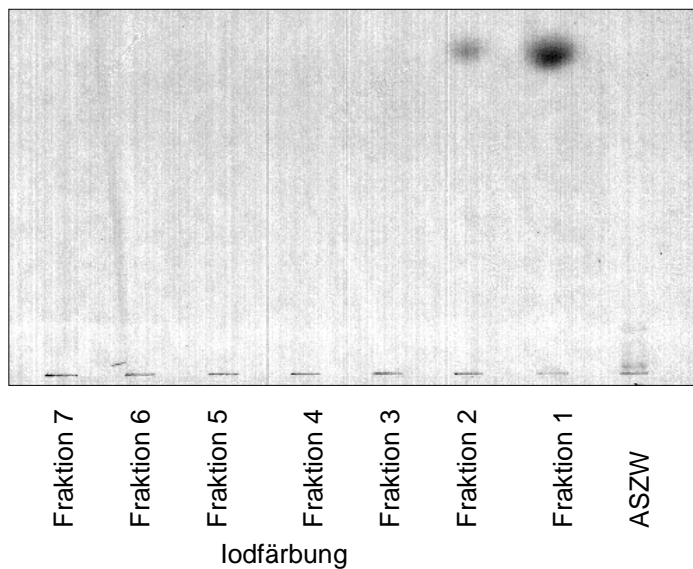
Abbildung 3: HPTLC des Gesamtpools des Le^X-Neoglycolipids nach Orcinol-/Schwefelsäurefärbung; als Kontrolle wurden Glycolipide der zwitterionischen Fraktion von *Ascaris suum* mit aufgetragen (ASZW) Laufmittel: C:M:W 50:40:10 + 0,25% KCl in H₂O.

Im Gesamtpool waren nun enthalten:

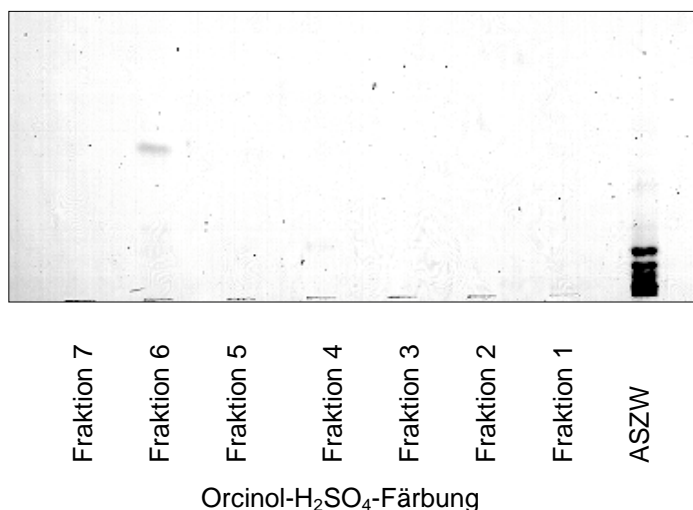
1. Nicht konjugiertes OS (freier Zucker), welches leicht zu erkennen ist, da die Bande seitlich verschoben ist
2. Synthetat (Neoglycolipid)
3. überschüssiges Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin (DHPE) (nicht zu sehen, weil es sich um eine Kohlenhydratfärbung handelt, \Rightarrow vgl. Abbildung 4).

3.1.2 Neoglycolipidaufreinigung

Das Reaktionsprodukt mußte nun von den anderen Bestandteilen getrennt werden, dazu eignete sich die Normalphasenkieselgelsäulenchromatographie (\Rightarrow s. 2.3.10). Aliquots der jeweils gewonnenen Fraktionen wurden durch HPTLC getrennt. Dann wurde einerseits ein Nachweis auf Lipide (Iodfärbung) und andererseits auf Kohlenhydrate (Orcinol- H_2SO_4 -Färbung) durchgeführt (\Rightarrow s. Abbildung 4).



\Leftarrow Phosphatidylethanolamin



\Leftarrow Le^X -Neoglycolipid

Abbildung 4: HPTLC der Einzel-
fraktionen des Gesamtpools
nach Fraktionierung; Kontrolle
(ASZW): s. Abb. 3
Iodfärbung (oben)
Orcinol/Schwefelsäurefärbung
(unten)
Laufmittel: C:M:W 50:40:10
+0,25% KCl in H_2O

Das unkonjugierte DHPE wurde durch unpolare Elutionsmittel eluiert und war in den beiden ersten Fraktionen (C:M 80:20 und 70:30) zu finden. Da im Synthetat an das relativ apolare DHPE ein polares OS gekoppelt ist, wurde das Glycolipid erst später, d.h. bei polareren Elutionsmitteln, von der Säule heruntergewaschen (Fraktion 6 [C:M:W 30:60:8]). Zur Kontrolle, ob die HPTLC prinzipiell geklappt hat, wurde auch hier zwitterionisches Glycolipid von *A. suum* (ASZW) mit aufgetragen.

3.1.3 MALDI-TOF-MS des Le^X-Neoglycolipids

Das so aufgereinigte Neoglycolipid wurde massenspektrometrisch charakterisiert. Eine einfache und geeignete Untersuchungsmethode dazu ist MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry). Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 5 dargestellt.

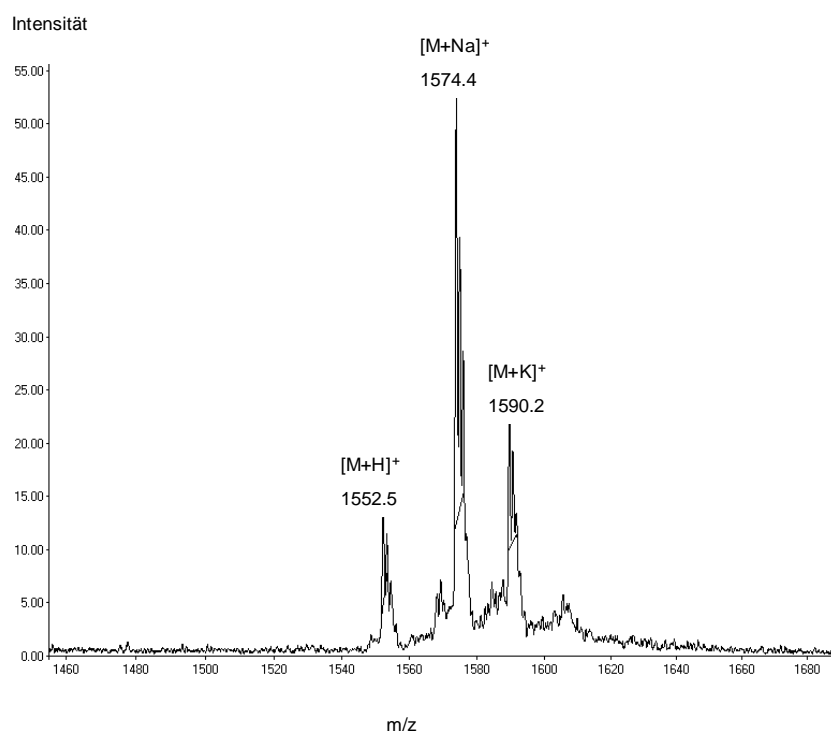


Abbildung 5:
MALDI-TOF-MS der
Fraktion 6 nach
Normalphasenkiesel-
gelchromatographie,
positiver Reflektor-
modus, ATT Matrix.

Die gemessene Masse des Natriumadduktes von 1574,4 Da stimmt mit der errechneten Masse desselben von 1573,9 Da gut überein. Es war somit gesichert, daß es sich bei dem aufgereinigten Reaktionsprodukt um das Le^X-Neoglycolipid handelte.

3.1.4 Quantifizierung des Le^X-Neoglycolipids durch Bausteinanalyse

Verwendet wurde zur Quantifizierung durch Bausteinanalyse (\Rightarrow s. 2.3.15) zusätzlich ein Standard, bei dem die Mengen der eingesetzten Kohlenhydrate bekannt waren, so daß über eine Integration der für die Monosaccharide erhaltenen einzelnen „Peak“-Flächen die Menge des Reaktionsproduktes bestimmt werden konnte. In Tabelle 6 sind am Beispiel des Le^X-DHPE Neoglycolipids die gemessenen Mengen der einzelnen Monosaccharide dargestellt, aus denen sich wiederum die Menge des OS berechnen läßt.

<u>Monosaccharid</u>	<u>gemessene Menge</u>
Galactose	0,98 μ mol; 178 μ g
N-Acetyl-Glucosamin	0,41 μ mol; 90 μ g
Fucose	0,52 μ mol; 85 μ g

Tabelle 6: gemessene Mengen an Monosacchariden aus 1% des Le^X-Neoglycolipids. Bausteinanalyse nach reduktiver Aminierung.

Die gemessenen Werte wurden mit den in die Synthese eingesetzten Mengen ins Verhältnis gesetzt, woraus sich die Ausbeute von etwa 40% ergab.

3.1.5 Synthese weiterer Neoglycolipide

Die gleichen Syntheseschritte sowie Trennungs- und Detektionsmethoden wurden auch für die Synthese eines Le^X-HDA (Le^X-Hexadecylanilin) Neoglycolipids, für die Synthese eines Le^A-DHPE (Lewis-A-DHPE) Neoglycolipids sowie für die Synthese eines Le^A-HDA Neoglycolipids eingesetzt, um noch weitere Standard-Testsubstanzen, die sich aber in ihren Eigenschaften unterscheiden, zur Verfügung zu haben. Abbildung 6 zeigt das zusammengefaßte Ergebnis der Neoglycolipidsynthesen von DHPE-Derivaten im direkten Vergleich miteinander.

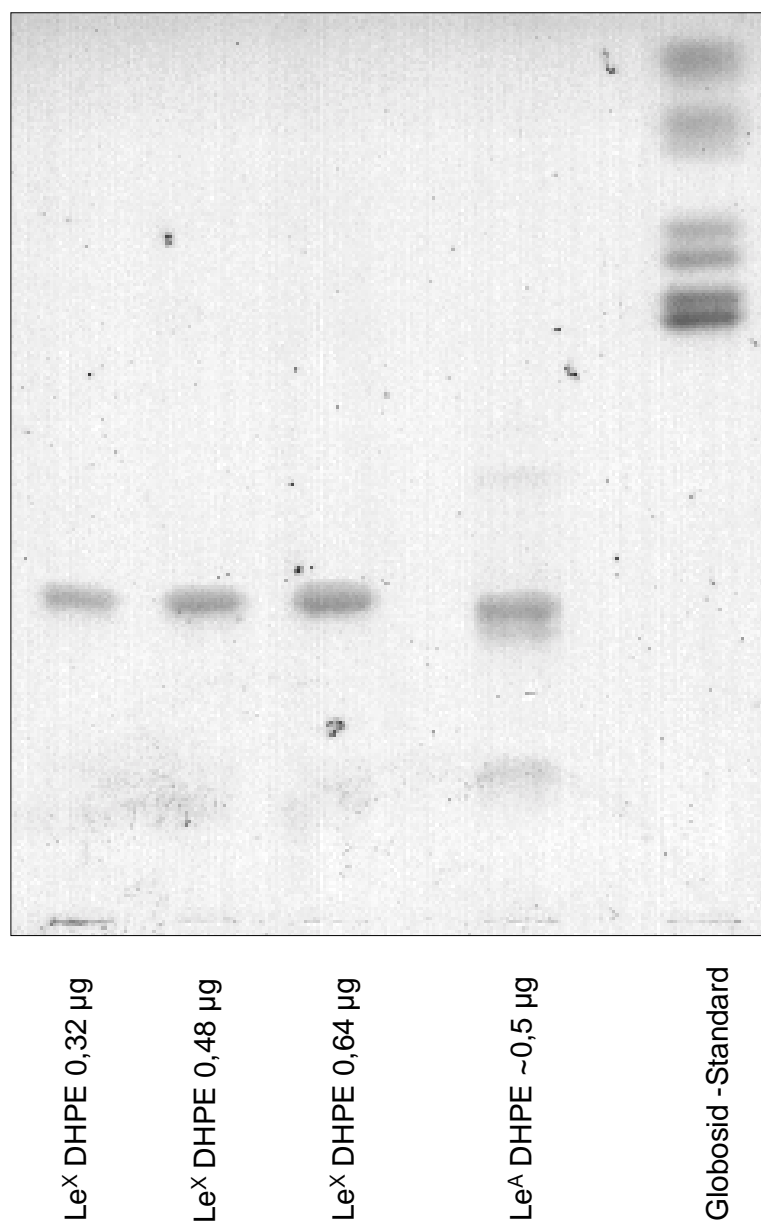


Abbildung 6: Vergleich der Ergebnisse der Neoglycolipidsynthesen von Le^{X} - und Le^{A} -Neoglycolipiden. Aufgetragen wurden, bezogen auf den Oligosaccharidanteil, unterschiedliche Mengen von Neoglycolipid. Laufmittel C:M:W 50:40:10 + 0,25 % KCl in H_2O Färbung Orcinol-Schwefelsäure.

3.1.6 Anti-Le^X Immunassays

Nachdem nun eine Positivkontrolle vorhanden war, konnte mit den Untersuchungen der Antikörper begonnen werden. Der mAK anti-Le^X-Antikörper (G8G12) (α -Le^X-mAK) wurde zunächst auf seine Bindungseigenschaften an Le^X-Neoglycolipid hin untersucht. Er wurde in unterschiedlichen Verdünnungen im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) getestet und nachfolgend bei der HPTLC - Immunfärbung und im IFT (Immunfluoreszenztest) eingesetzt. Die Abbildung 7 zeigt das Bindungsverhalten des α -Le^X-mAK im ELISA bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des AK einerseits und unterschiedlichen Neoglycolipidmengen andererseits.

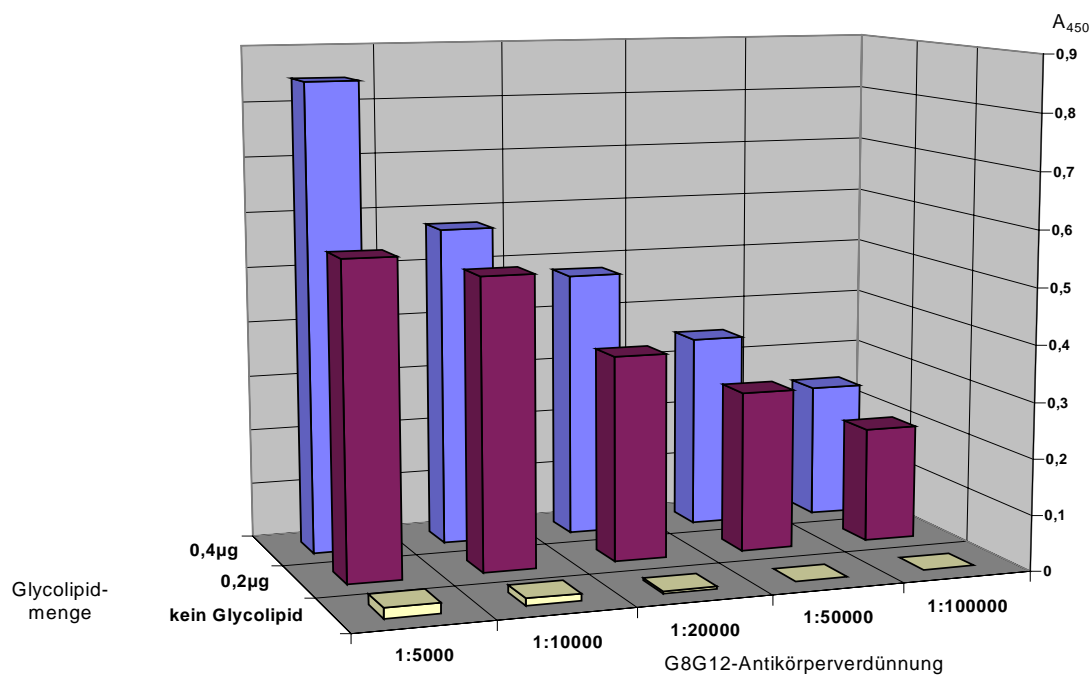


Abbildung 7: Antikörper- und Antigenverdünnungsreihe des mAK G8G12 (α -Le^X-mAK), Zweitantikörperverdünnung R α M-HRP 1:2000

Im getesteten Verdünnungsbereich nahm die Bindung des Antikörpers mit steigender Antikörperkonzentration zu, eine Sättigung wurde nicht erreicht. Weiterhin war die Bindung abhängig von der Neoglycolipidmenge. Der Antikörper hatte selbst bei extrem hoher Verdünnung noch gute Detektionsergebnisse, somit eine sehr hohe Sensitivität.

3.1.7 Antikörperinhibitionsuntersuchungen

Des weiteren wurde der α -Le^X-mAK bei gleicher Menge an Glycolipid (0,4 μ g pro Vertiefung) und unterschiedlichen Verdünnungen des Zweitantikörpers im ELISA untersucht. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

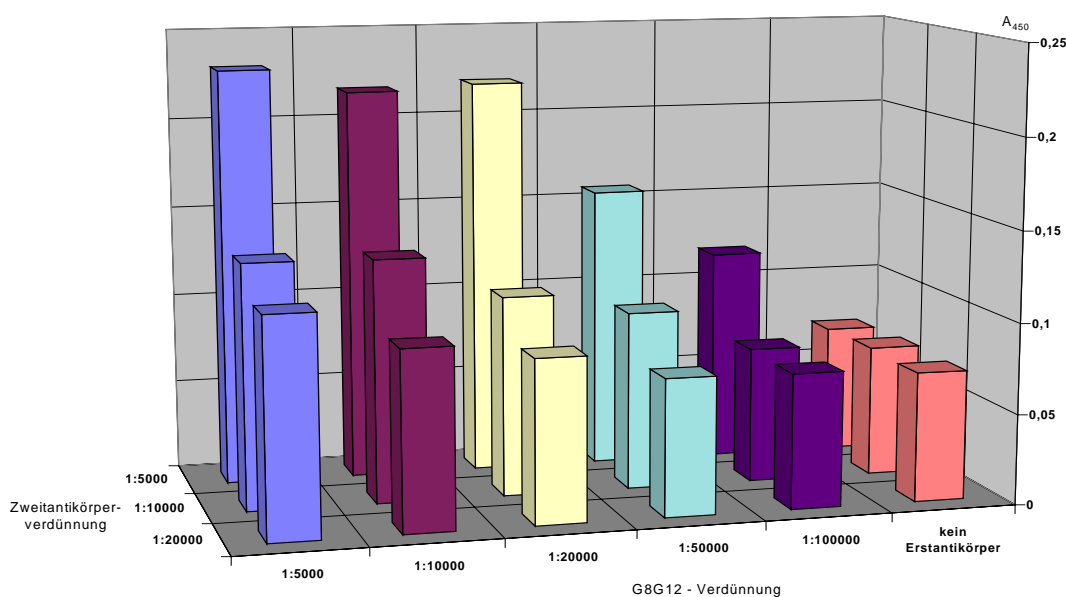


Abbildung 8: Antikörperverdünnungsreihe des α -Le^X-mAK (G8G12) bei unterschiedlicher Detektion durch den Zweitantikörper R α M-HRP, Glycolipidmenge 0,4 μ g Le^X-DHPE

Die eingesetzte Menge des Zweitantikörpers war gerade bei hohen Verdünnungsstufen des Erstantikörpers von großer Wichtigkeit, um gegenüber der Kontrolle überhaupt noch ein Signal detektieren zu können.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit sich der α -Le^X-mAK durch eine vorgeschaltete Inkubation mit freier Fucose bzw. dem Le^X-OS inhibieren läßt. In Abbildung 9 ist das Ergebnis des ELISA dargestellt, nachdem der verdünnte α -Le^X-mAK (G8G12) bei RT eine Stunde lang in Microröhrchen mit unterschiedlichen Mengen von Fucose inkubiert wurde. Die an die ELISA-Platte adsorbierte Glycolipidmenge betrug jeweils 0,4 μ g, der α -Le^X-mAK war auf 1:5000, der Zweitantikörper R α M-HRP auf 1:2000 verdünnt.

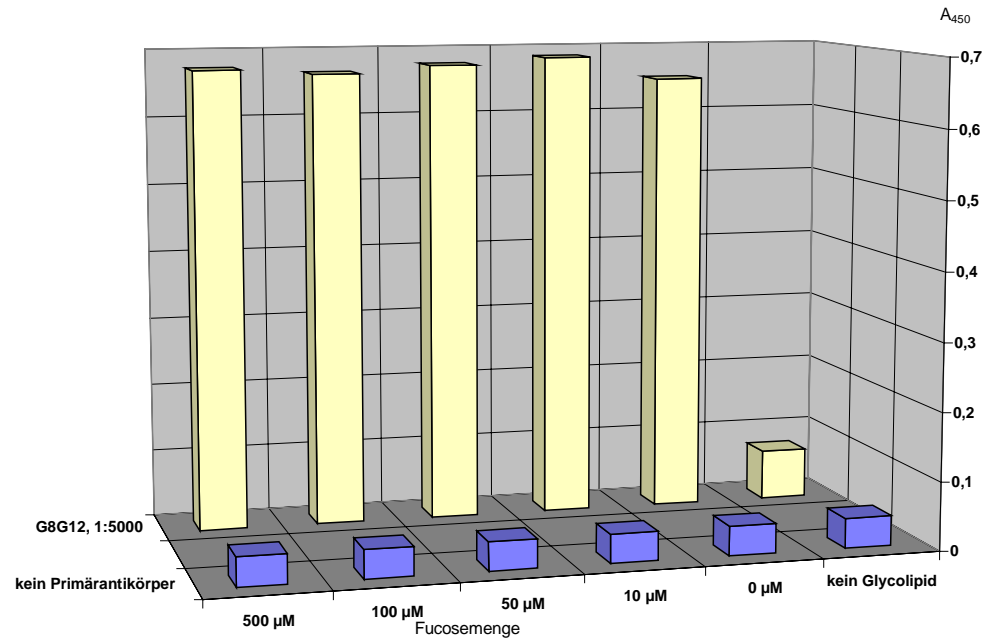


Abbildung 9: Inhibitions-ELISA des α -Le^X-mAK (G8G12) nach Fucoseinkubation, Glycolipidmenge: 0,4 µg Le^X-DHPE, Zweitantikörper R α M-HRP 1:2000

Da sich keine Abnahme der Extinktion bei vorheriger Inkubation mit Fucose einstellte, wurde in einem nachfolgenden Experiment untersucht, wie sich der α -Le^X-mAK (G8G12) bei vorgeschalteter Inkubation mit Le^X-OS anstelle von Fucose bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen verhält. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt. Auf der linken Hälfte des Diagramms ist das Verhalten des AK jeweils mit und ohne vorhergehende Le^X-OS-Inkubation bei Anwesenheit von Glycolipid, auf der rechten Hälfte ebenfalls mit und ohne vorangehende Le^X-OS-Inkubation jedoch bei Abwesenheit von Glycolipid dargestellt.

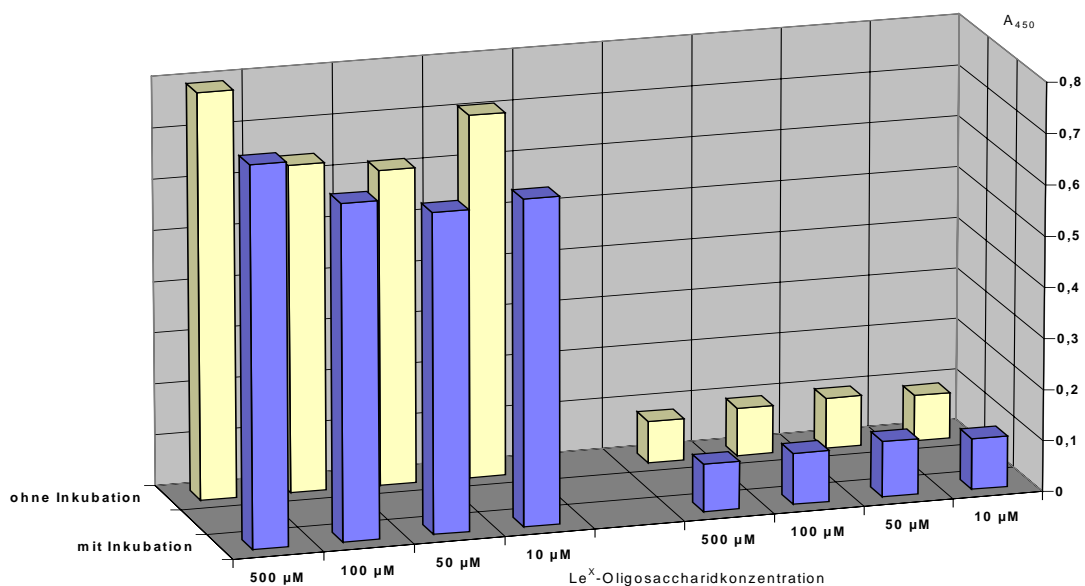


Abbildung 10: Inhibitions-ELISA des α -Le^X-mAK (G8G12) nach Le^X-OS-Inkubation, Glycolipidmenge: 0,4 µg Le^X-DHPE, Zweitantikörper R α M-HRP 1:2000

Wie man sehen kann, war eine Inhibition des Antikörpers sowohl mit Fucose als auch mit Le^X-OS unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich, eine Abnahme der Extinktion konnte in keinem der beiden Fälle gezeigt werden.

3.1.8 Le^X-Untersuchungen am adulten Wurm

An Gefrierschnitten von adulten *S. mansoni*-Würmern wurden immunologische Untersuchungen auf Le^X durchgeführt, wobei sich im IFT folgendes Bild (⇒s. Abbildung 11) zeigte:

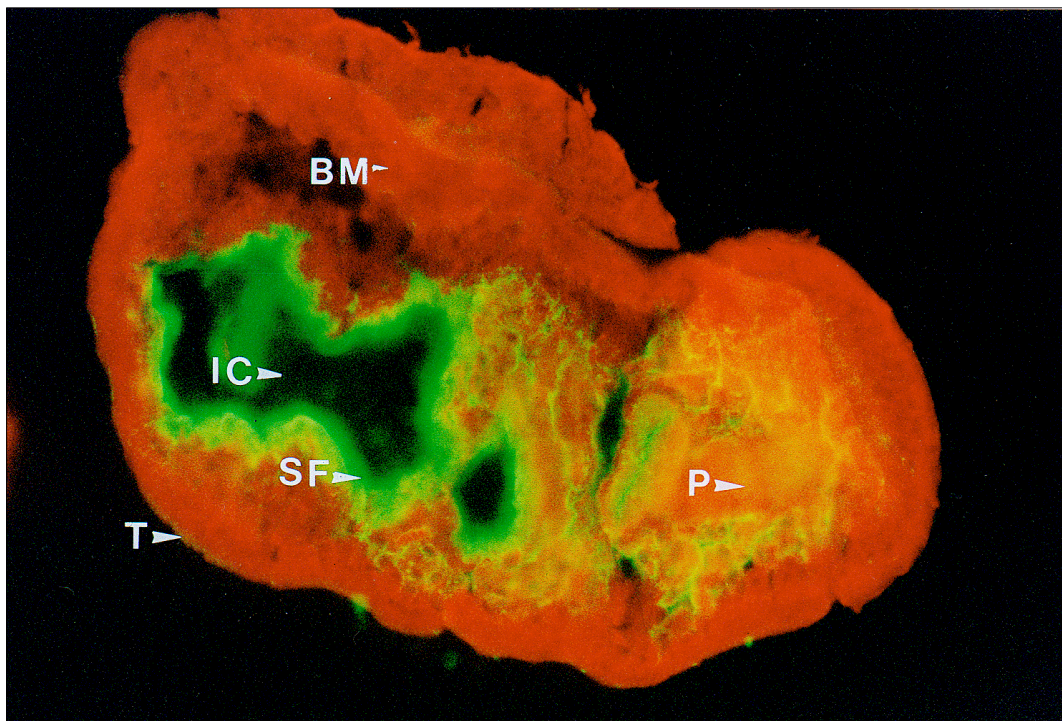


Abbildung 11: Gefrierschnitt quer durch den männlichen *S. mansoni* Adultwurm und Inkubation mit dem α -Le^X-mAK (G8G12). Spezifische Fluoreszenz (SF) im Intestinum (IC [intestinal caeca]). Tegument (T), Parenchym (P) und Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]) zeigen nur Hintergrundfluoreszenz. Antikörperverdünnung: 1:100, Zweitantikörperverdünnung R α M-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

Man sieht einen Schnitt quer durch den männlichen Wurm. Le^X-positive Signale zeigten sich grün, die Gegenfärbung mit *Evans blue* stellte sich rot dar und die gelbe Farbe war eine unspezifische Fluoreszenz. Die spezifische Fluoreszenz war eindeutig dem Darm des Wurmes zuzuordnen, alle anderen Bereiche waren Le^X negativ.

Man konnte nun durch weitere Untersuchungen (Chloroform/Methanol – Extraktion, Trypsin-Verdau) die erkannten Epitope Lipiden bzw. Proteine zuordnen.

Verdaute man einen Gefrierschnitt von *S. mansoni* 5 Minuten lang mit Trypsin 0,1%, so konnte man – wie in Abbildung 12 zu sehen ist – die spezifische Fluoreszenz, die im Nativschnitt noch zu sehen war, auslöschen. Führt man hingegen am Nativpräparat eine 30 minütige Extraktion mit C:M 1:1 durch, so konnte man erkennen, daß die Fluoreszenz nach wie vor klar auf dem Schnitt zu sehen war (\Rightarrow s. Abbildung 13).

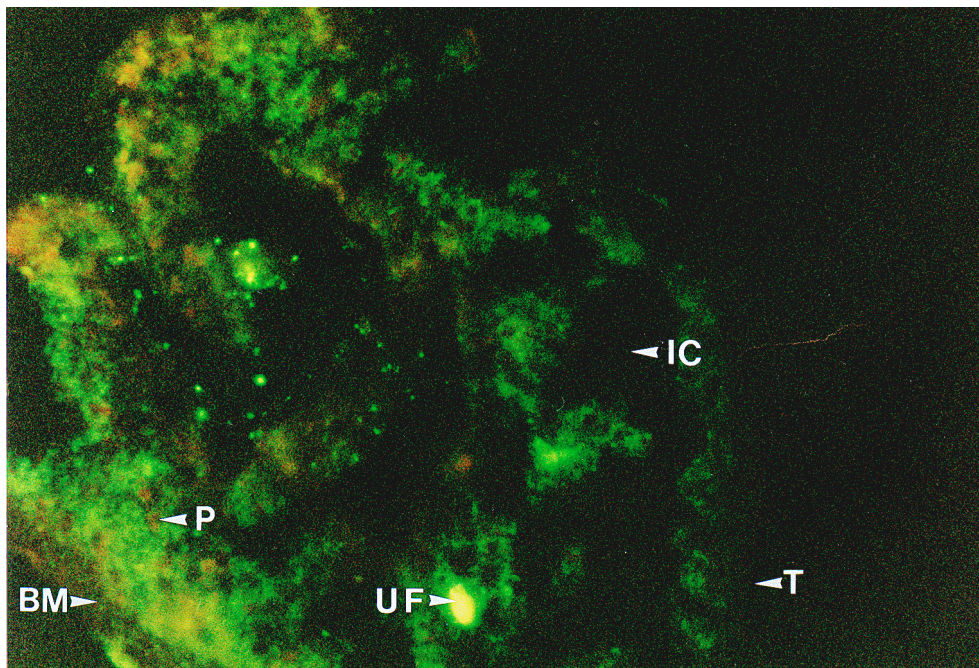


Abbildung 12: Gefrierschnitt quer durch den männlichen *S. mansoni* Adultwurm nach 5 min Verdau mit 0,1% Trypsin und nachfolgender Inkubation mit dem α -Le^X-mAK (G8G12). Keine spezifische Fluoreszenz mehr detektierbar. Unspezifische Fluoreszenz (UF), Intestinum (IC [intestinal caeca]), Tegument (T), Parenchym (P) und Körperwandmuskulatur (BM [body wall musculature]). Antikörperversdünnung: 1:100, Zweitantikörperversdünnung R α M-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

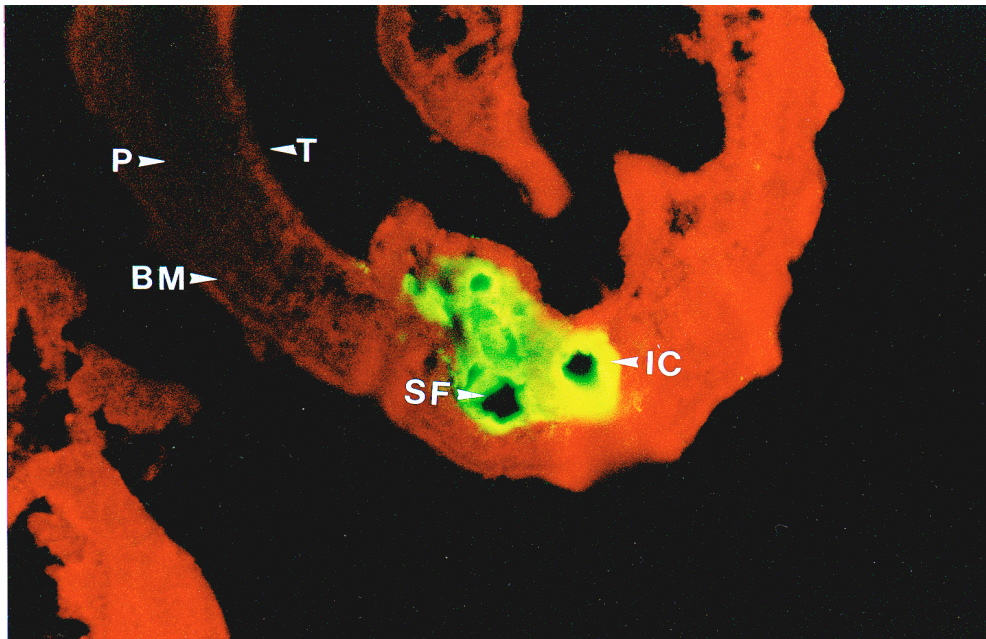


Abbildung 13: Gefrierschnitt quer durch männlichen *S. mansoni* Adultwurm nach 30 min C:M (1:1, v/v) Extraktion und nachfolgender Inkubation mit dem α -Le^X-mAK (G8G12). Spezifische Fluoreszenz (SF) im Intestinum (IC [intestinal caeca]). Tegument (T), Parenchym (P) und Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]) zeigen nur Gegenfärbung (Evans blue). Antikörperverdünnung: 1:100, Zweitantikörperverdünnung R α M-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

Somit wurde gezeigt, daß Le^X-Epitope beim adulten Wurm nur auf Glycoproteinen zu finden waren.

3.1.9 Le^X-Untersuchung von Glycolipiden

Untersuchte man Glycolipide verschiedener Entwicklungsstadien von *S. mansoni* (adulte Würmer, Cercarien, Eier) auf ihre Le^X-Eigenschaften, so zeigte sich, daß lediglich Glycolipide von Cercarien signalpositive Banden zeigten. In Abbildung 14 ist eine HPTLC mit den stadienunterschiedlichen Glycolipiden von *S. mansoni* in einer anti Le^X-Immunfärbung mit dem anti-Le^X-mAK *Bickle 1* (G8G12) dargestellt.

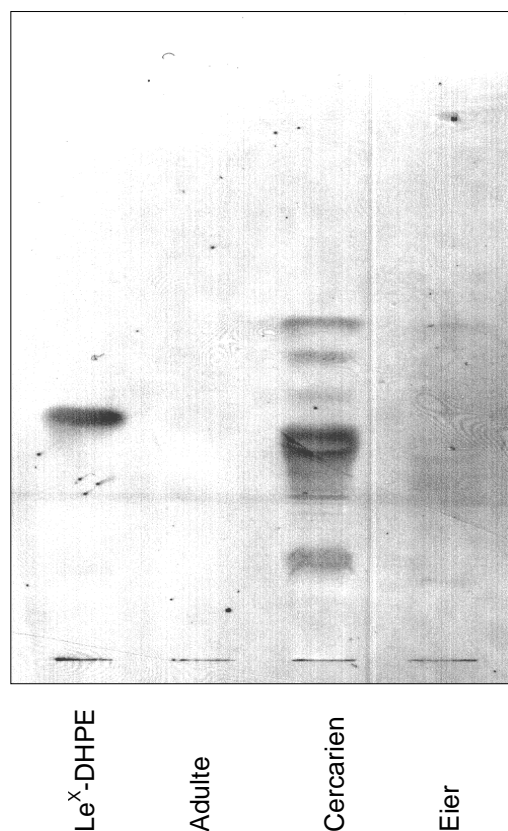


Abbildung 14: HPTLC stadienspezifischer Glycolipide von *S. mansoni*, Laufmittel C:M:W 50:40:10 + 0,25% KCl in H₂O, Immunfärbung mit dem α -Le^x-mAK (G8G12), AK-Verdünnung 1:200, Zweitantikörperverschüttung R α M-HRP 1:4000, Färbereagens DEPDA

Man sah, daß Le^x-positive Glycolipidepitope im wesentlichen nur bei Cercarien zu finden waren und der Adultwurm keine Le^x-positiven Glycolipidepitope hatte. Dies deckte sich mit den am adulten Wurm gewonnenen Ergebnissen (\Rightarrow s. 3.1.8), bei denen sich die Le^x-positiven Epitope nicht durch eine Lipidextraktion, jedoch mit einer enzymatischen Proteolyse eliminieren ließen.

3.2 Untersuchungen mit weiteren mAK

Weitere mAK - Untersuchungen folgten nach dem gleichen Schema: zunächst Studien im ELISA, auf der HPTLC und zum Schluß im Gefrierschnitt. Es handelte sich um mAK, die uns von Dr. Quentin Bickle und Dr. D. Dunne zur Verfügung gestellt worden waren.

3.2.1 Untersuchungen weiterer mAK im ELISA

Bei den angefertigten ELISA-Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob sich ein Erkennungsmuster bei den unterschiedlichen Antikörpern erkennen läßt, das es erlauben würde, die Antikörper in Gruppen ähnlicher Spezifität einzuteilen. Die aufgetragenen Glycolipidmengen wurden daher ausreichend gewählt, die Antikörperverdünnungen einheitlich (1:500). Auch die Zweitantikörperverdünnung blieb einheitlich (1:2000) ebenso die Färbezeit (10 min). Bei dem „screening“ ergaben sich zwei unterschiedliche Gruppen bzw. Erkennungsmuster von Antikörpern (\Rightarrow s. Abbildungen 15 und 16) gegen Glycolipide verschiedener Entwicklungsstadien von *S. mansoni*.

Man sah, daß es zwei unterschiedliche Erkennungsmuster gab:

die erste Gruppe von mAK erkannte vorwiegend Antigenstrukturen bei Glycolipiden von adulten Würmern und Eiern, die 2. Gruppe band an Glycolipide von allen 3 Entwicklungsstadien.

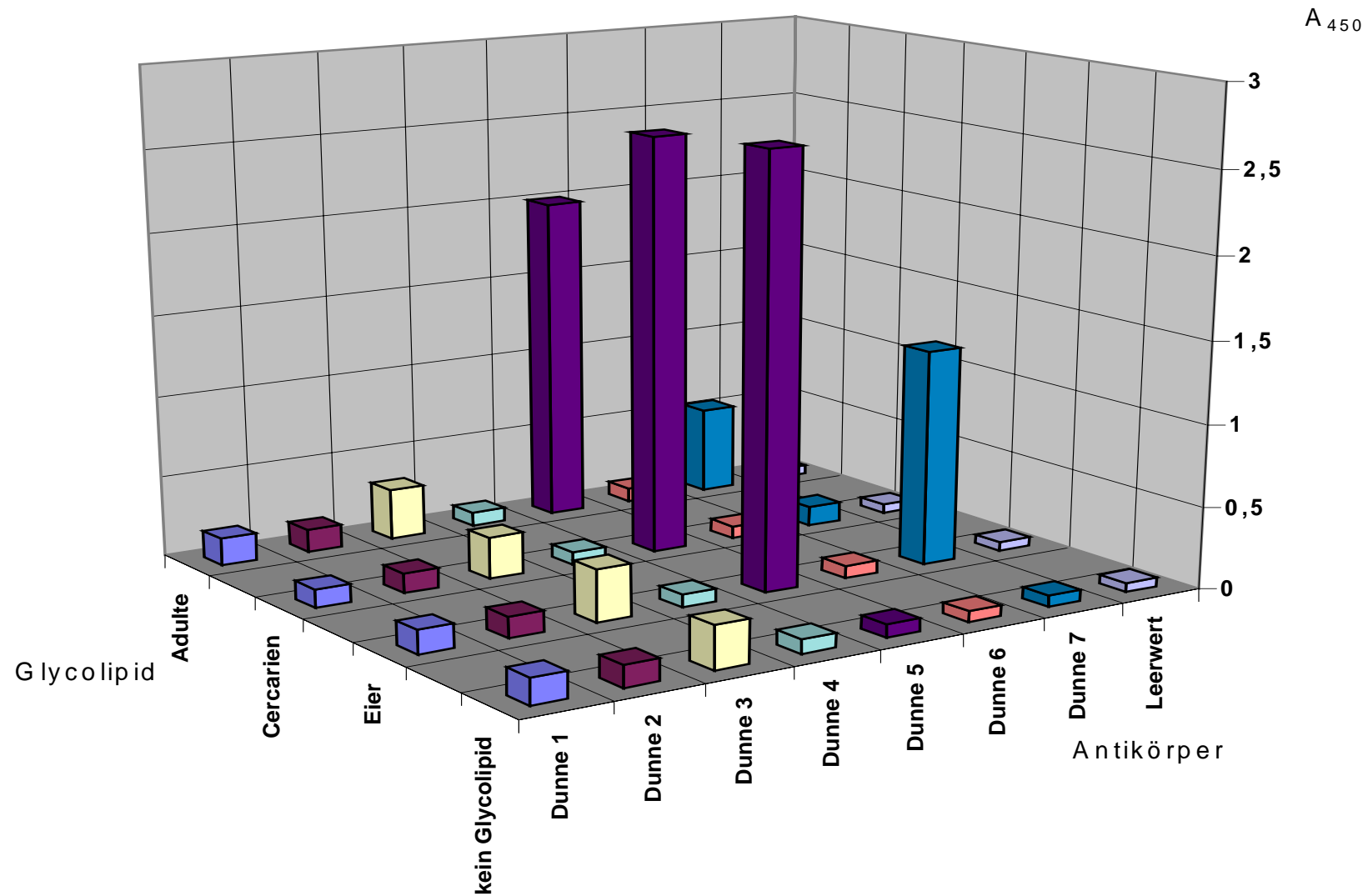


Abbildung 15: Vergleich unterschiedlicher Antikörper hinsichtlich ihrer Antigenspezifität bei Glycolipiden unterschiedlicher Stadien von *S. mansoni* durch ELISA. Antikörperverdünnung (Dunne) 1:500. Die aufgetragene Menge an Glycolipiden von adulten Würmern entsprach 100 µg, von Cercarien 10 µg und von Eiern 1 µg Trockengewicht. Zweitantikörper RαM-HRP 1:2000

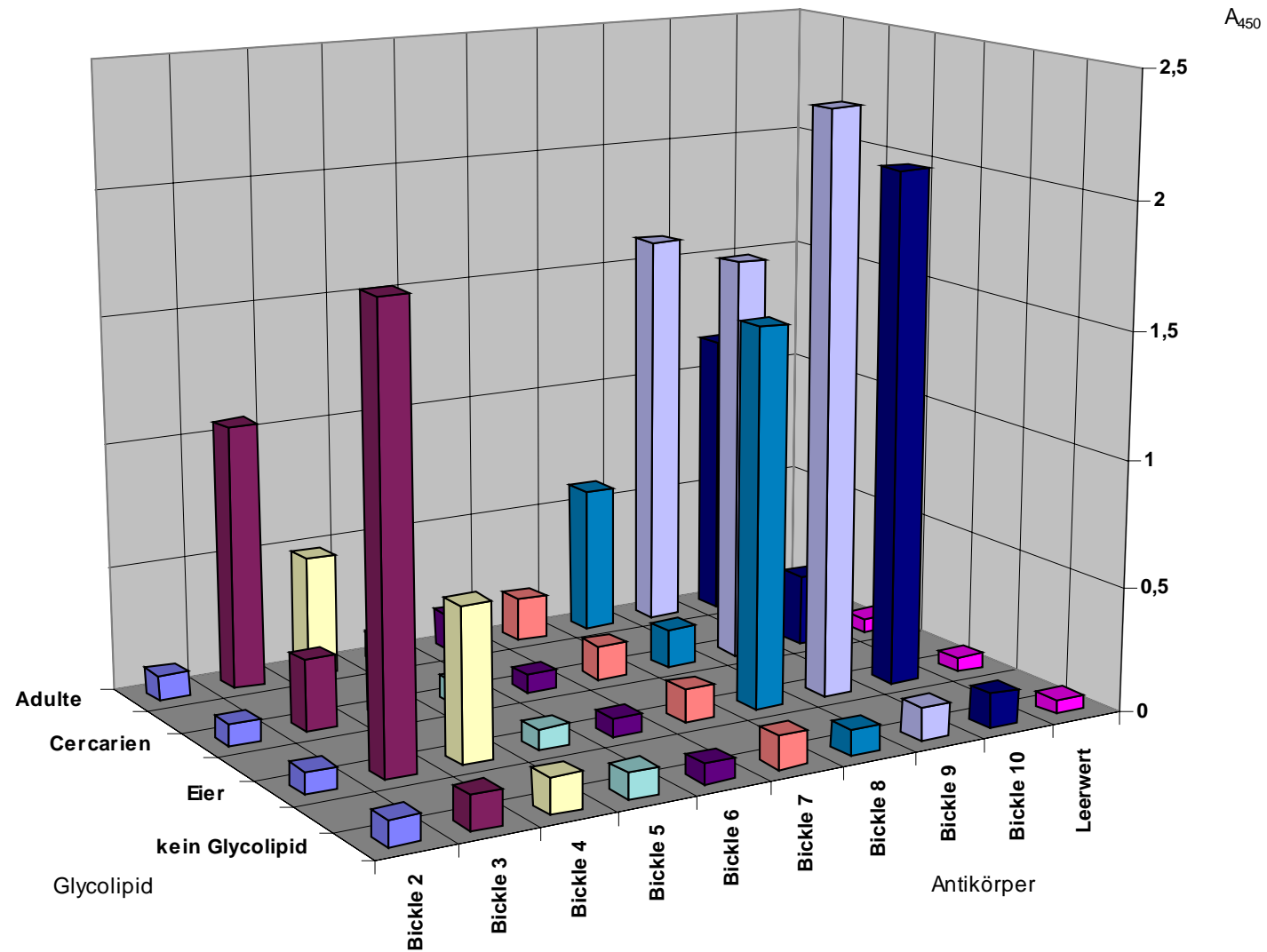


Abbildung 16: Vergleich unterschiedlicher Antikörper hinsichtlich ihrer Antigenspezifität bei Glycolipiden unterschiedlicher Stadien von *S. mansoni* im ELISA. Antikörperverschüttung (Bickles) 1:500. Die aufgetragene Menge an Glycolipiden von adulten Würmern entsprach 100 µg, von Cercarien 10 µg und von Eiern 1 µg Trockengewicht. Zweitantikörper RαM-HRP 1:2000

3.2.2 Untersuchungen weiterer Antikörper im Gefrierschnitt

Untersuchte man nun die Erkennungseigenschaften der Antikörper im Gefrierschnitt bei adulten Würmern, so ließen sich auch hier unterschiedliche Erkennungsmuster herausarbeiten, die in den Abbildungen 17 bis 22 aufgezeigt werden.

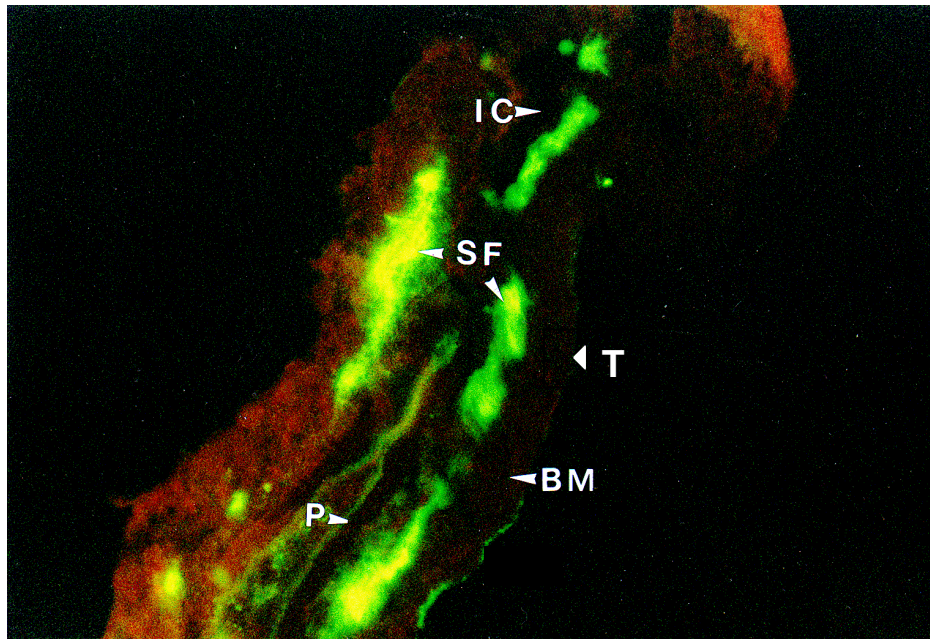


Abbildung 17: Partieller Längsschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm. Inkubation mit dem mAK Bickle 8 (C1C9). Spezifische Fluoreszenz (SF) im submuskulären Anteil des Gefrierschnittes, keine Fluoreszenz im Bereich des restlichen Parenchyms (P), der Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]), des Tegumentes (T) oder des Intestinums (IC [intestinal caeca]). Antikörperverdünnung 1:100, Zweitantikörperverdünnung RαM-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

In Abbildung 17 zeigte sich eine spezifische Fluoreszenz im submuskulären Anteil des adulten Wurmes. Sie wurde, wie in Abbildung 18 gezeigt, durch eine C:M Extraktion ausgelöscht, blieb jedoch, wie in Abbildung 19 gezeigt, nach Verdau mit Trypsin 0,1% bestehen.

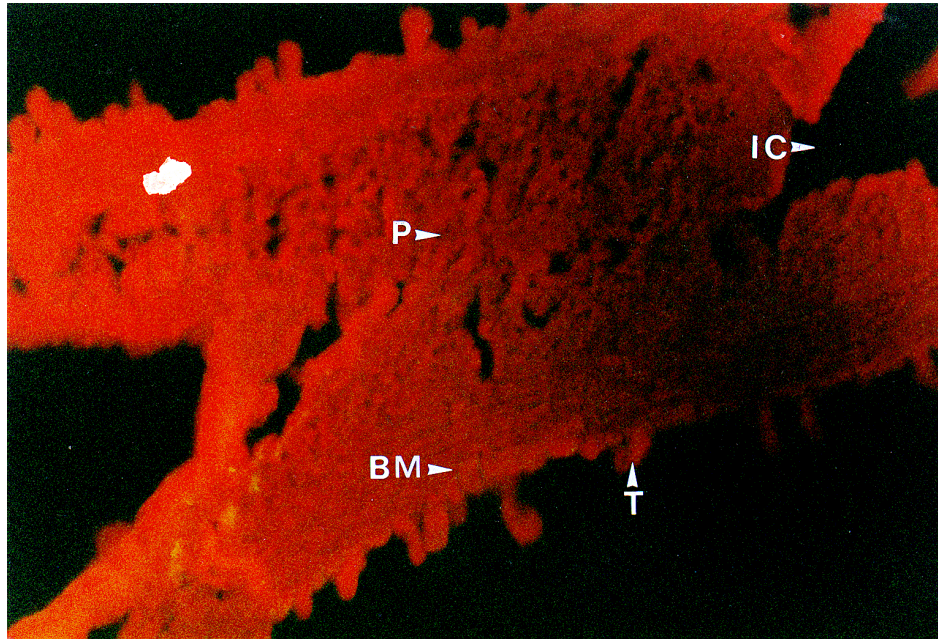


Abbildung 18: Partieller Längsschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, C:M Extraktion und Inkubation mit dem mAK Bickle 8 (C1C9). Vollständige Auslöschung jeglicher Fluoreszenz, die im nativen Schnitt noch bestand (\Rightarrow s. Abbildung 17). Parenchym (P), Tegument (T), Intestinum (IC [intestinal caeca]), Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]). Antikörperverdünnung 1:100, Zweitantikörperverdünnung R α M-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

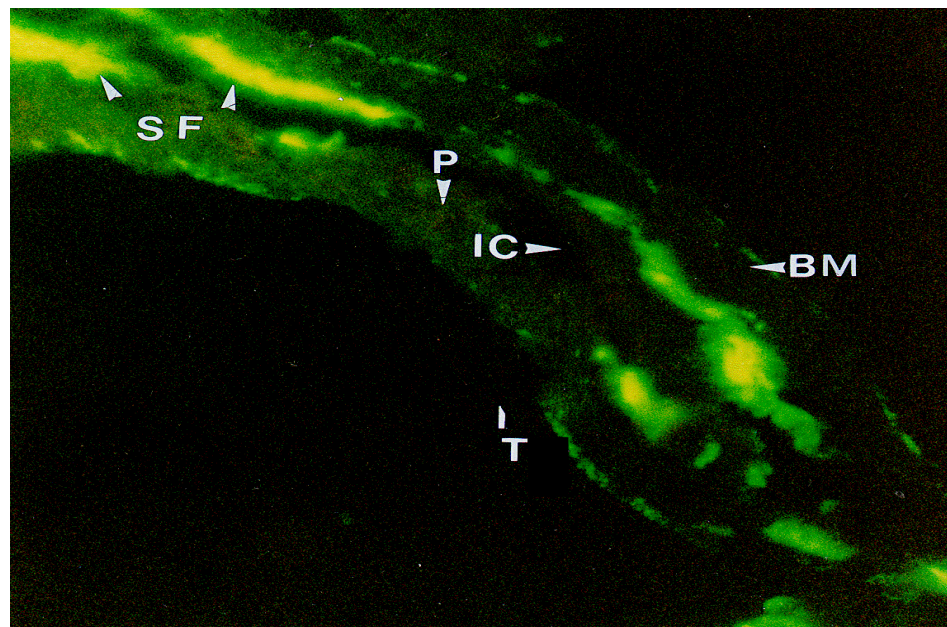


Abbildung 19: Partieller Längsschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, Verdauung mit Trypsin (0,1%) für 5 min und Inkubation mit dem mAK Bickle 8 (C1C9). Spezifische Fluoreszenz (SF) im submuskulären Anteil des Wurmes. Im Bereich des Parenchyms (P), der Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]), des Intestins (IC [intestinal caeca]), und des Tegumentes (T) keine spezifische Fluoreszenz. Antikörperverdünnung 1:100, Zweitantikörperverdünnung R α M-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

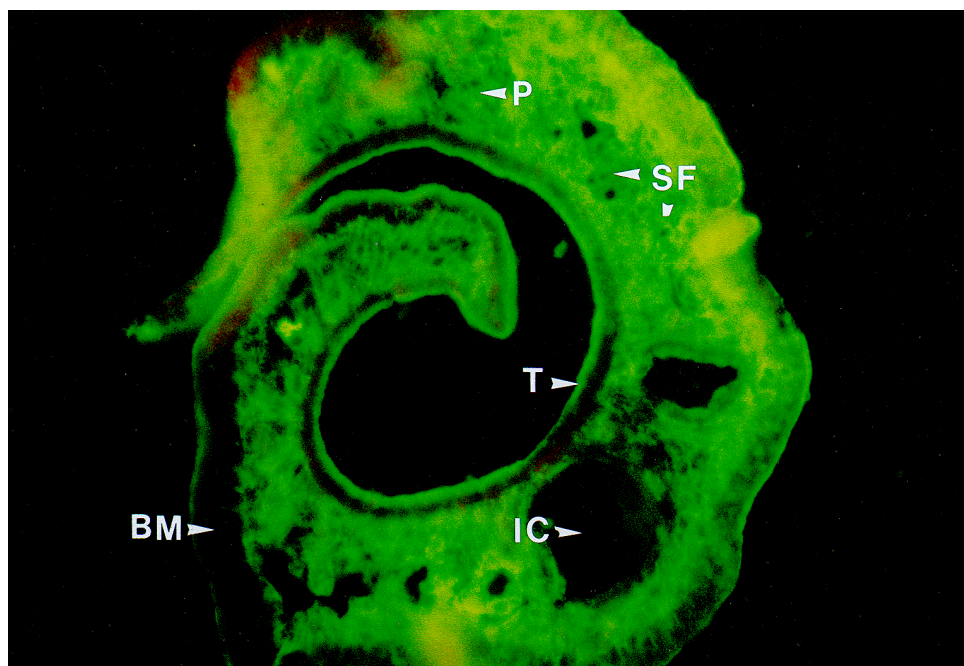


Abbildung 20: Querschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, Inkubation mit dem mAK Dunne 5 (B7B3 [anti-K3 IgM]). Spezifische Fluoreszenz (SF) über das gesamte Parenchym (P) und das Tegument (T), keine Fluoreszenz im Bereich der Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]) und des Intestinums (IC [intestinal caeca]). Antikörperversdünnung 1:100, Zweitantikörperversdünnung RαM-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

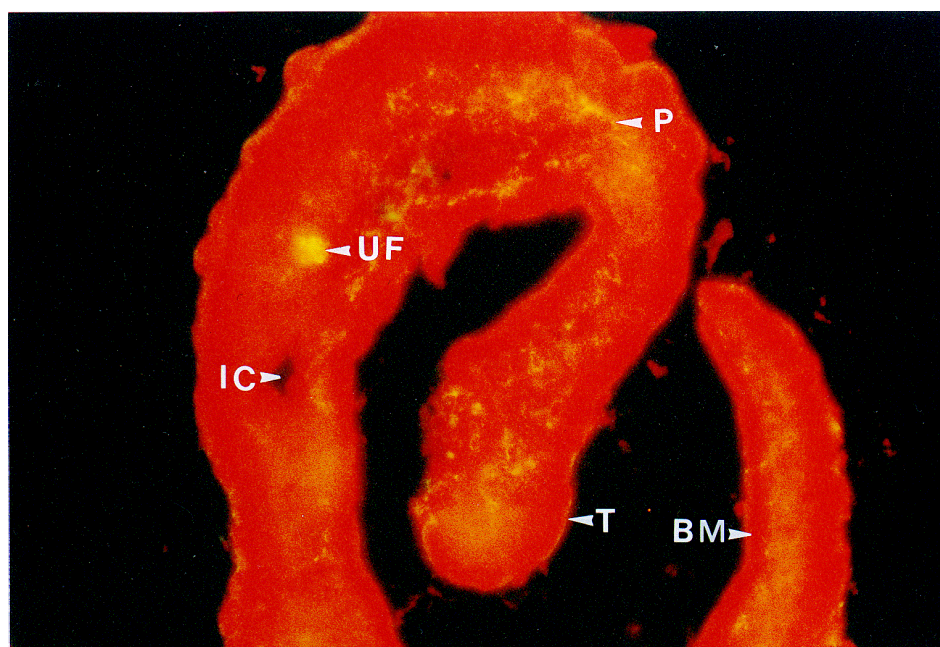


Abbildung 21: Querschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, C:M Extraktion und nachfolgende Inkubation mit dem mAK Dunne 5 (B7B3 [anti-K3 IgM]). Völlige Auslöschung der im Nativschnitt vorhandenen Fluoreszenz (⇒s. Abbildung 20), vereinzelt unspezifische Fluoreszenz (UF). Parenchym (P), Tegument (T), Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]), Intestinums (IC [intestinal caeca]). Antikörperversdünnung 1:100, Zweitantikörperversdünnung RαM-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

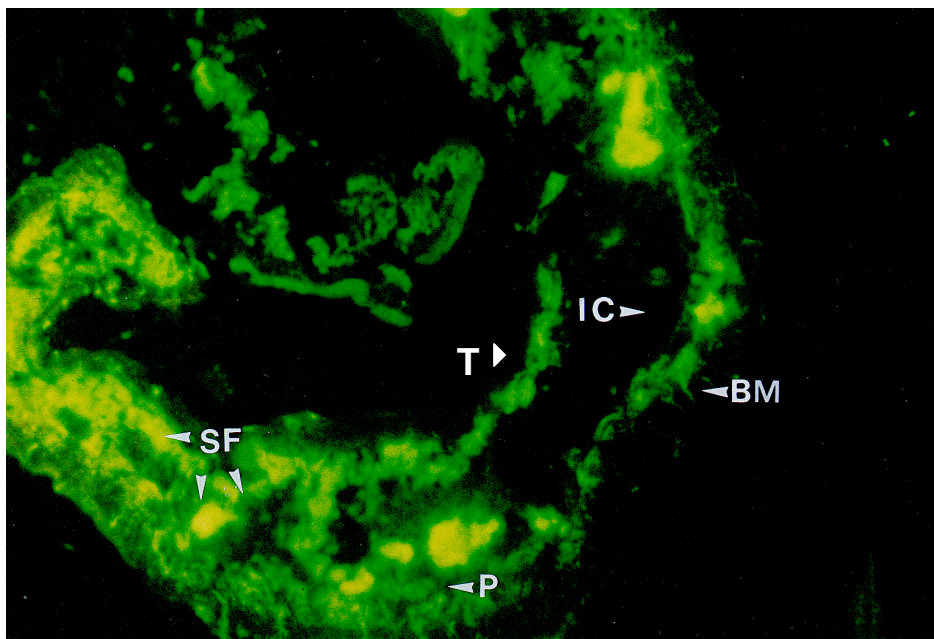


Abbildung 22: Querschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, Verdau mit Trypsin (0,1%) und nachfolgender Inkubation mit dem mAK Dunne 5 (B7B3 [anti-K3 IgM]). Spezifische Fluoreszenz (SF) über das gesamte Parenchym (P) und das Tegument (T), keine Fluoreszenz im Bereich der Körperwandmuskulatur (BM [bodywall musculature]) und des Intestinums (IC [intestinal caeca]). Antikörperverdünnung 1:100, Zweitantikörperverdünnung RαM-FITC 1:20, Vergrößerung 400 f.

Die Antikörper, gezeigt am Beispiel des mAK *Dunne 5* (B7B3 [anti-K3 IgM]), die Epitope aller drei Entwicklungsstadien im ELISA erkannten, detektierten im IFT eines Gefrierschnittes offensichtlich ein Epitop, das sich mit Ausnahme der Körperwandmuskulatur und des Intestinums gleichmäßig über das Parenchym verteilt darstellt.

Die Antikörper, gezeigt am Beispiel des mAK *Bickle 8* (C1C9), deren Epitoperkennung im ELISA auf Glycolipide von adulten Würmern und Eiern konzentriert war, erkannten auch im IFT eines Gefrierschnittes nur ein ganz spezielles, submuskulär gelegenes Areal im Parenchym, keinesfalls das vollständige Parenchym, genausowenig Körperwandmuskulatur, Tegument oder Intestinum. Ebenso, wie bei den Le^X-Untersuchungen am Gefrierschnitt, wurden auch hier Untersuchungen bezüglich der Lokalisation der Epitope angestellt, nämlich ob sie lipid- oder proteingebunden sind. Bei beiden Epitopen konnte gezeigt werden, daß sie auf Lipiden zu finden sind, da sie nach C:M-Extraktion nicht mehr nachweisbar waren, nach Trypsin-Verdau jedoch bestehen blieben.

3.2.3 Untersuchungen weiterer Antikörper mittels APAAP

Die Zuordnung des bei den Abbildungen 17 und 19 erkannten Areals erforderte nun weitere Untersuchungen. Die immunhistologische Färbung nach dem APAAP-System bietet hierzu Möglichkeiten, die die im IFT gesehene Struktur bei *S. mansoni* noch feiner darstellt.

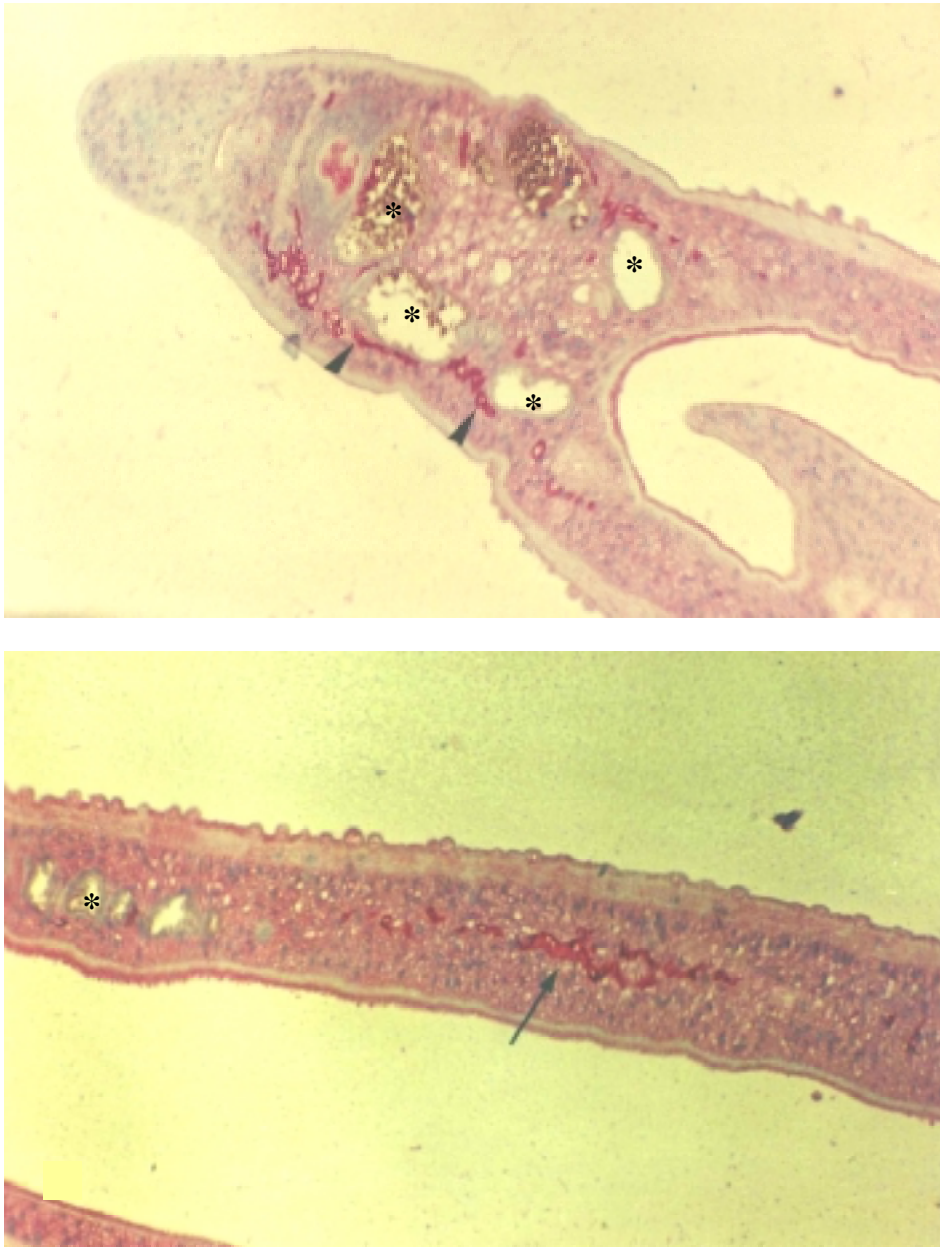


Abbildung 23: APAAP – Färbung eines partiellen Längsschnittes durch einen kryogefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, Inkubation mit dem mAK Bickle 3 (C1C7 \cong C1C9). Spezifische Anfärbung (Pfeilmarkierungen) im Bereich des Kopfganglions und der Kopfnerven (oberes Bild) und im Verlauf des Längsnerven (unteres Bild). Der Oesophagus (*) stellte sich mit bläulicher Wandkontur und bräunlichem Inhalt (Erythrozyten) dar.

Man erkannte deutlich die spezifische rote Anfärbung besonders im Bereich des Kopfes des Wurmes, jedoch waren auch im weiteren Verlauf des Wurmes immer wieder Anschnitte zu finden, die spezifisch angefärbt waren. Es handelte sich hierbei am ehesten um das Nervensystem des Wurmes; die im Kopfbereich angefärbten Strukturen entsprachen den Kopfganglien, die Anschnitte im mittleren und hinteren Teil des Wurmes den Anschnitten des vorderen bzw. hinteren Längsnerven (\Rightarrow vgl. Abbildungen 2 und 23) (45) (46).

Für den Antikörper aus der Reihe derer, die im ELISA Glycolipide aller drei untersuchter Stadien erkennen, war eine Organzuordnung nicht möglich, denn auf dem Gefrierschnitt fluoreszierte nahezu das gesamte Parenchym.

3.2.4 Untersuchungen weiterer Antikörper mittels HPTLC

Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen wurden alle Antikörper dahingehend untersucht, ob sie Epitope auf Glycolipiden erkennen. In der folgenden Abbildung soll dies exemplarisch an Hand des mAK *Bickle 3* gezeigt werden.

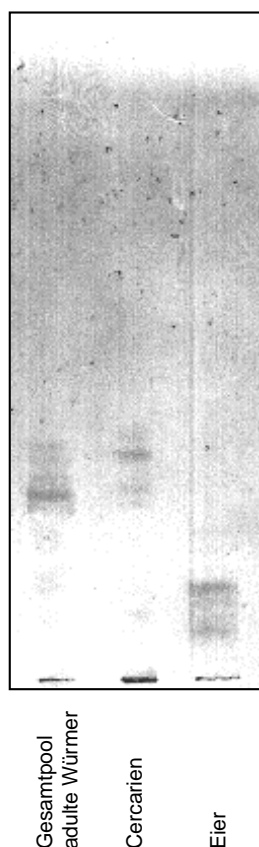


Abbildung 24: HPTLC von stadienspezifischen *S. mansoni* Glycolipiden. Immunfärbung mit dem mAK Bickle 3 (C1C7) AK-Verdünnung 1:200, Zweitantikörper R α M-HRP 1:500, Färbereagens DEPDA, Laufmittel C:M:W 50:40:10 + 0,25% KCl in H₂O.

Man konnte zeigen, daß der mAK *Bickle 3* Glycolipide aller 3 Stadien erkennt. Bei Glycolipiden des Entwicklungsstadiums Eier war der Kohlenhydratanteil viel höher.

3.3 Untersuchungen auf Le^A – Epitope

Glycolipide und Gefrierschnitte von *S. mansoni* wurden auf mögliche Le^A-Epitope hin untersucht. Die Abbildung 25 zeigt zunächst die – analog zu Le^X (⇒ s. 2.3.10, 2.3.13, 3.2; 3.3, 3.4) hergestellte – Positivkontrolle anhand des synthetisierten Le^A-Neoglycolipids, die Abbildung 26 die Untersuchungsergebnisse bei Glycolipiden von *S. mansoni* von anti-Le^A-mAK im Gefrierschnitt. Man erkannte, daß es – ähnlich wie bei Le^X – eine Erkennung im Bereich des Intestinums gab (⇒ vgl. 3.1.8).

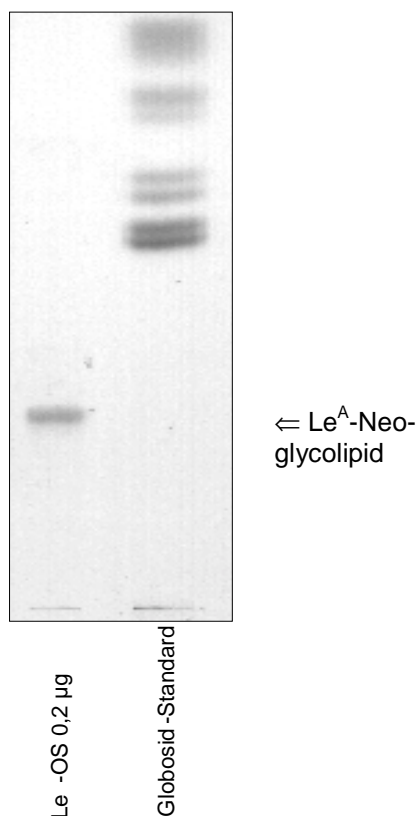


Abbildung 25: HPTLC des Neoglycolipids Le^A-DHPE. Die aufgetragene Menge entspricht der durch Bausteinanalyse bestimmten Menge des im Neoglycolipid vorhandenen Oligosaccharides. Als Kontrolle wurde ein Globosid-Standard mit aufgetragen. Laufmittel C:M:W 50:40:10 + 0,25% KCl in H₂O Färbung Orcinol/Schwefelsäure

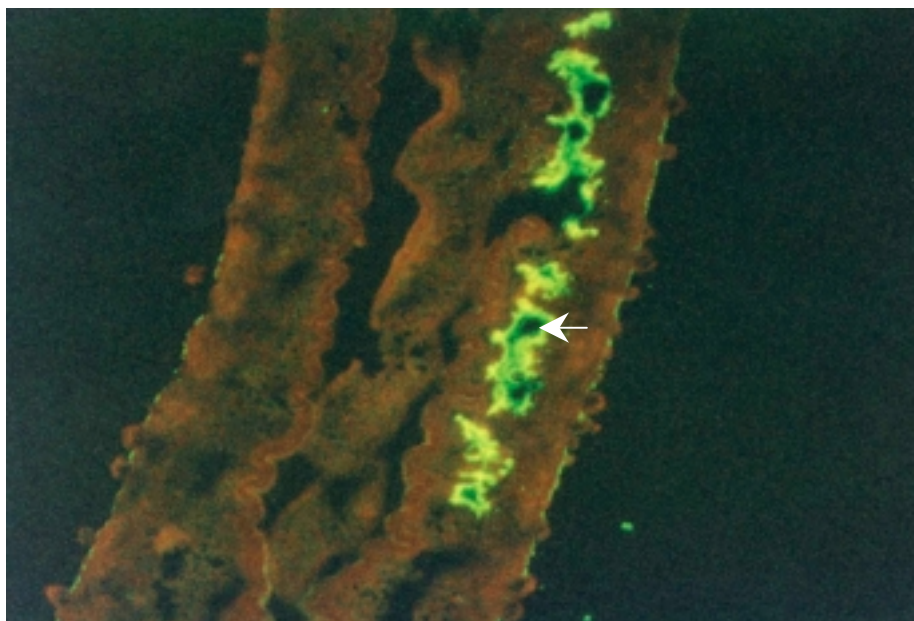


Abbildung 26: Partieller Längsschnitt durch den gefrorenen männlichen *S. mansoni* Adultwurm, Inkubation mit dem α -Le^A-mAK. Spezifische Fluoreszenz im Bereich des Darmes (Pfeilmarkierung). Antikörperverdünnung 1:100, Zweitantikörper R α M-FITC 1:20 Vergrößerung 250f.

Des weiteren konnte eine Kreuzreaktivität bezüglich der Erkennung von Le^X-Epitopen durch den α -Le^A-mAK ausgeschlossen werden. Abbildung 27 zeigt, daß sowohl der mAK *Bickle 1* (G8G12) als auch der α -Le^X-mAK 4D1 Glycolipide von Cercarien von *S. mansoni* sowie das Le^X-Neoglycolipid erkannten, der α -Le^A-mAK hingegen nicht.

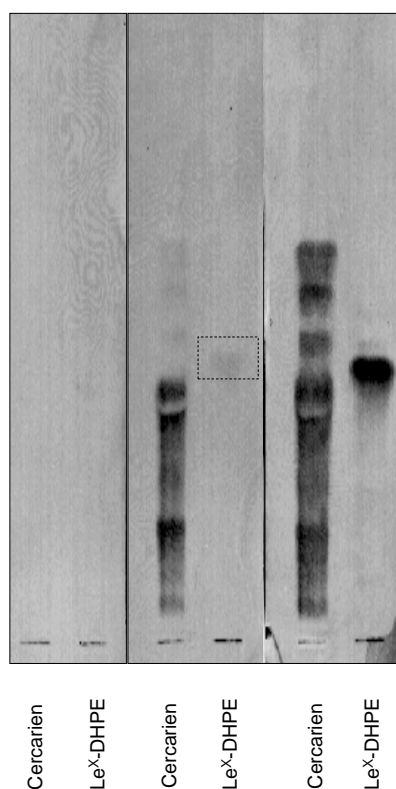


Abbildung 27: HPTLC von Glycolipiden von Cercarien von *S. mansoni* sowie Le^X-Neoglycolipid. Immunfärbung von rechts nach links mit den Antikörpern *Bickle 1* (G8G12, Verdünnung 1:200), α -Le^X-mAK (4D1, Verdünnung 1:500) und α -Le^A-mAK, Verdünnung 1:20). Färbereagenz DEPDA, Laufmittel C:M:W 50:40:10 + 0,25% KCl in H₂O

Gefrierschnitte von *S. mansoni* wurden auch auf die Blutgruppenantigene A und B hin untersucht, in beiden Fällen war ein Nachweis derselben nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Gewinnung adulter Würmer

Die Gewinnung adulter Würmer zur weiteren Untersuchung war mitunter schwierig, denn zum einen ist bei einer Infektion der Mäuse bei gleicher Anzahl der aufgetragenen Cercarien nie sicher vorauszusagen, wie viele Cercarien die Haut penetrieren und somit zu einer Infektion führen, zum anderen muß die Gewinnung der adulten Würmer aus dem zwar narkotisierten, aber noch lebenden Tier erfolgen, ohne daß man exakt voraussagen kann, wie viele Würmer man gewinnen wird. Eine abwartende Haltung, bis die infizierten Tiere durch die Erkrankung selbst gestorben sind, ist deswegen nicht möglich, da sich aus toten Tieren keine Würmer mehr gewinnen lassen.

4.1.2 Aufbereitung der gewonnenen Würmer

Ein Ziel dieser Arbeit war es, morphologische (immuno-morphologische) Studien an *S. mansoni* zu betreiben. Ein erstes Problem, welches auftrat, war, daß die frisch gewonnenen Würmer beim Einbetten in das Einbettmedium für Gefrierschnitte sich aufgrund ihrer Eigenelastizität bohnenförmig verformten und so eine einheitliche Ausrichtung nicht erreicht werden konnte. Ein Weg, dieses Problem zu lösen, bestand darin, daß der Wurm, eingebettet von einer kleinen Menge des Einbettmediums, zwischen zwei Objektträgern fixiert wurde, diese mit flüssigem Stickstoff abgekühlt wurden, mit einer Rasierklinge dann das Präparat abgelöst und in einem größeren Block des Einbettmediums nochmals eingefroren wurde. Die Herstellung von Gefrierschnitten aus einem Konglomerat vieler Würmern war dieser Methode unterlegen.

Die gewonnenen Schnitte hingegen konnten – anders als beispielsweise bei *A. suum*. – auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen und von dort aus problemlos weiterverarbeitet werden. Da es sich bei den Gefrierschnitten um sehr kleine Präparate handelte, waren die mehrfelderigen (6 Felder) Objektträger eine Erleichterung, was die

dann folgenden Untersuchungen anbelangte. Nicht nur, daß vergleichende Untersuchungen anhand einer Schnittserie durchgeführt werden konnten, auch die benötigten Probenmengen der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper waren mit ca. 30 µl pro Feld recht gering, was einen sparsamen Umgang mit den Materialien ermöglichte.

4.2 Immunologische/immunhistochemische Charakterisierung von *S. mansoni*-Glycolipiden

Vergleicht man die bei den Glycolipiduntersuchungen mittels ELISA und HPTLC gewonnenen Daten mit den Erkennungsmustern, die die Antikörper auf Schnitten von adulten Würmern zeigen, so kristallisierten sich 3 verschiedene Erkennungsmuster heraus:

1. Die als „*Bickle 1*“ bezeichneten Epitope, denen die mAK G8G12 und 4D1 zugeordnet wurden, die in der HPTLC und im ELISA Glycolipide von Cercarien und das Le^X-Neoglycolipid erkannten und in der Immunfluoreszenz ein im Darm des Wurmes gelegenes Epitop markierten, welches sich nach Trypsinverdau nicht mehr nachweisen ließ.

2. Die als „*Bickle 3*“ bezeichneten Epitope, denen die mAK C1C7 und C1C9 zugeordnet wurden, die in der HPTLC Glycolipide aller drei untersuchter Stadien von *S. mansoni*, im ELISA jedoch signifikanterweise nur Glycolipide von adulten Würmern und Eiern erkannten und in der Immunfluoreszenz/Immunhistochemie definierte Strukturen unterhalb des Tegumentes und im Bereich des Kopfes des Wurmes markierten, die sich nach einer Lipidextraktion mit C:M nicht mehr nachweisen ließen.

3. Die als „*Bickle 9*“ bezeichneten Epitope, denen die mAK M2D3H und B7B3 ($\hat{=}$ *Dunne 5*) zugeordnet wurden, die in der HPTLC und im ELISA Glycolipide aller untersuchten Entwicklungsstadien von *S. mansoni* erkannten und in der Immunfluoreszenz das gesamte Parenchym des Wurmes markierten, welche nach Extraktion mit C:M nicht mehr nachweisbar war.

Über das M2D3H-Epitop ist mittlerweile bekannt, daß es sich um ein antigenes Kohlenhydrat-Motiv handelt, welches über eine terminale Fucose verfügt, die α 1-3 an GalNAc gebunden ist und eine Endstruktur von Glycolipiden von *S. mansoni* darstellt. Dieses Kohlenhydratepitop war zuvor nur auf o-glycosidisch gebundenen Glycanen der Glycocalix von Cercarien gefunden worden (47,48). Es unterscheidet sich deutlich von den LDN (LacdiNAc), LDN-F(fucosyliertes LDN) und LDN-DF (difucosyliertes LDN) Strukturen, die ebenfalls als antigene Determinanten der Glycokonjugate von *S. mansoni* beschrieben wurden (49). Des weiteren zeigt das Fuc(α 1-3)GalNAc-Epitop eine Kreuzreaktivität zu KLH (keyhole limpet hemocyanin) und läßt sich durch KLH im ELISA inhibieren (50). Es zeigt sich hier eine Parallelität zu dem ductalen Antigen (51), welches ebenfalls mit KLH kreuzreagiert.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Methoden direkt auf dem Gefrierschnitt konnte ein einfaches und aussagekräftiges Werkzeug aufgezeigt werden, welches Rückschlüsse bezüglich der Eigenschaft der gefundenen Epitope zuläßt. Durch direkten enzymatischen Verdau, bzw. durch Lipidextraktion konnte schnell und sicher eine Aussage getroffen werden, ob es sich bei den erkannten Epitopen um lipid- oder proteingebundene Strukturen handelte. Es ist im weiteren durchaus denkbar, daß Varianten dieser Methodik zu einer selektiveren Bestimmung unterschiedlicher antigenen Eigenschaften genutzt werden kann, beispielsweise durch den Einsatz von Glycosidasen, die spezifisch Monosaccharide aus dem OS abspalten (ähnlich dem „on target-Verdau“ von Glycoantigenen in Verbindung mit MALDI-TOF-MS (52).

4.2.1 Zuordnung zu Organsystemen

Die in dieser Arbeit gezeigten Resultate zeigen im IFT ein ähnliches Muster, wie es schon in anderen Arbeiten veröffentlicht wurde (49,51,53). Jedoch sind die in dieser Arbeit angefärbten Gewebestrukturen in gewisser Hinsicht different. So ließ sich bei den hier beschriebenen Untersuchungen – anders als bei den Untersuchungen von Boogers, Nibbeling et al. 1994 (53) – mit dem mAK „*Bickle 3*“ nicht das Tegument anfärben (\Rightarrow vgl. Abbildung 23), ebenso zeigte er – anders als der mAK 114-5B1-A (53)– im ELISA kein Signal bei den Glycolipiden von Cercarien. Auch in der Immuno-HPTLC von Glycolipiden von *S. mansoni* lassen sich durch den mAK „*Bickle 3*“ gänzlich andere Banden anfärben als durch den mAK 114-5B1-A (Daten noch nicht

publiziert). Trotz eines ähnlichen mikroskopischen Bildes sind hier Unterschiede festzustellen. Es ist somit fraglich, ob die hier beobachtete Struktur dem in den zitierten Arbeiten postulierten exkretorischen System zuzuordnen ist, oder ob es sich – wie von mir angenommen – eher um die Darstellung eines Teiles des Nervensystems von *S. mansoni* handelt. Die Untersuchungen von Gustafsson (45) und Brownlee et al. (46) sind vom mikroskopischen Bild her den hier gezeigten Strukturen ebenfalls sehr ähnlich, letztere sind jedoch wesentlich feiner dargestellt. Es muß zu diesem Zeitpunkt offen bleiben, um welche Struktur es sich hierbei letztendlich handelt.

In nahezu allen Arbeiten, die sich mit Glycoantigenen und deren morphologischem Erscheinungsmuster bei *S. mansoni* befassen, wurde bislang wenig darüber berichtet, ob neuronale Strukturen in diesem Zusammenhang nicht auch einen antigenen Charakter besitzen und wie diese sich darstellen könnten.

4.2.2 Le^X und Le^A bei *Schistosoma mansoni*

In der Literatur ist bekannt, daß Le^X ein Strukturelement ist, das auf Glycoproteinen im adulten Wurm vorkommt und im Wirt zu einer Immunantwort führt (1), wobei, wie hier gezeigt werden konnte, die Le^X-positiven Epitope sich vornehmlich im Entwicklungsstadium Cercarie auf Glycolipiden nachweisen lassen (20,21,54). Weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema haben nun auch geringere Anteile an Le^X-positiven Epitope auf Glycolipiden von Eiern von *S. mansoni* nachweisen können.

Bei den Untersuchungen im Gefrierschnitt läßt sich Le^X im Bereich des IC nachweisen (1,55), wobei nicht eindeutig zu zeigen ist, ob es sich bei der Fluoreszenz um Darmwandepithelien oder noch um im Darm befindliche Erythrozyten handelt. Da das Le^X-Antigen (neben anderen Blutgruppenantigenen wie Le^A, Le^B, und Le^Y) sich im Blut befinden kann, ist dies zumindest kritisch in Erwägung zu ziehen. Andererseits wurde bereits mehrfach gezeigt, daß Le^X-Epitope sich auf durch den Wurm selbst produzierten Glycoproteinen nachweisen ließen und auch auf CCA vorhanden sind (15,26,56).

Aufgrund der chemischen Strukturähnlichkeit zwischen Le^X (Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAcβ1-R) und Le^A (Galβ1-3[Fucα1-4]GlcNAcβ1-R), wobei es sich bei beiden Epitopen um Blutgruppenantigene handelt, und der Tatsache, daß Le^A-Epitope auch bei anderen Parasiten gefunden wurden (z.B. *Fasciola hepatica* (57,58), wurden Untersuchungen angestellt, ob auch Le^A-Epitope auf Gefrierschnitten von *S. mansoni* nachweisbar sind. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich Le^A-Epitope auf

Gefrierschnitten von adulten *S. mansoni* nachweisen lassen. Sie zeigen im IFT ein Bild, wie es schon im Fall von Le^{X} beobachtet worden war. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß Le^{A} -Epitope bei *Fasciola hepatica*, analog zu dem hier beobachteten Bild, im Intestinum nachgewiesen wurden. Allerdings konnten – anders als bei Le^{X} – keine Le^{A} -positiven Epitope auf Glycolipiden von *S. mansoni* nachgewiesen werden. Es ist aufgrund des Untersuchungsergebnisse davon auszugehen, daß die Le^{A} -Epitope bei adulten Würmern nur auf Glycoproteinen nachweisbar sind. Hier sollten weiterführende Untersuchungen zu diesem Glycoantigen erfolgen.

4.2.2.1 Bedeutung von $\text{Le}^{\text{X}}/\text{Le}^{\text{A}}$ bezüglich Immunevasion

Über die immunologische Bedeutung von Le^{X} im menschlichen Organismus wurde bereits in der Einleitung berichtet, über Le^{A} in Zusammenhang mit *Schistosomiasis* ist diesbezüglich nicht sehr viel bekannt. Auch Le^{A} ist ein Blutgruppenantigen, es wurde auf Erythrozyten, Intestinalzellen (59) und (wie auch Le^{X}) auf Zellen von Adenocarcinomen (60-63) gefunden. Bei *S. mansoni* konnte Le^{A} bislang nicht nachgewiesen werden (64). Interessant ist, daß sich beide hier untersuchten Lewis-Antigene bei Adenocarcinomen finden lassen. Ob sich daraus ableiten läßt, daß die beiden Epitope eine Funktion in der Immunevasion übernehmen, muß offen bleiben.

5. Zusammenfassung

Die Lokalisation verschiedener antigener Epitope bei *S. mansoni* und die Eigenschaften der eingesetzten Antikörper waren Kernpunkte dieser Arbeit. Es konnte auf einfache Art und Weise gezeigt werden, wie unterschiedliche Glycoepitope bezüglich ihrer Verankerung auf Lipiden oder Proteinen zu unterscheiden sind und welche Unterschiede sie morphologisch aufzeigen.

Es konnten 3 unterschiedliche Gruppen monoklonaler Antikörper identifiziert und näher charakterisiert werden. Zwei Gruppen erkannten antigene Epitope von Glycolipiden unterschiedlicher Entwicklungsstadien, die dritte Gruppe erkannte Le^X-Epitope, die bei Cercarien auf Lipiden, bei adulten Würmern auf Proteinen nachgewiesen wurden.

Im Gefrierschnitt färbte die letztere Gruppe den Darm, die zweite Gruppe eine unterhalb der Körperwandmuskulatur gelegene Struktur und eine weitere das gesamte Parenchym an, wobei die beiden letzteren glycolipidgebundene Epitope und erstgenannte glycoproteingebundene Epitope waren. Damit war die Gruppierung, die sich aufgrund der Untersuchungen mittels ELISA und HPTLC ergab, auch hinsichtlich des Anfärbemusters im Gefrierschnitt nachzuvollziehen.

Im Detail zeigte sich bei einem der glycolipiderkennenden mAK der zweiten Gruppe morphologisch eine Struktur, die nicht eindeutig zuzuordnen war. Es könnte sich sowohl um Nervengewebe, als auch um Drüsengewebe handeln.

Weiterhin wurde gezeigt, daß neben den schon bekannten und häufig beschriebenen Le^X-Epitopen auch Le^A-Epitope auf Gefrierschnitten von *Schistosoma mansoni* nachweisbar sind. Sie könnten ähnlich wie Le^X einen Beitrag zur Immunmodulation/Immunevasion des Parasiten leisten. Ihre letztendliche Bedeutung bleibt jedoch abzuwarten.

6. Literatur

1. Cummings, R. D., und Nyame, A. K. (1996) Glycobiology of schistosomiasis. *FASEB J.* **10**, 838-848
2. Nash, T. E., Ottesen, E. A., und Cheever, A. W. (1978) Antibody response to a polysaccharide antigen. II. Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 944-950
3. Deelder, A. M., und Kornelis, D. (1980) *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. *Exp. Parasitol.* **50**, 16-32
4. Deelder, A. M., van Dam, G. J., Kornelis, D., und Fillié, Y. E. (1996) *Schistosoma*: analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. *Parasitology* **112**, 21-35
5. de Jonge, N., Kremsner, P. G., Krijger, F. W., Schommer, G., Fillié, Y. E., Kornelis, D., van Zeyl, R. J., van Dam, G. J., Feldmeier, H., und Deelder, A. M. (1990) Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 815-818
6. Abdeen, H. H., Attallah, A.-F. M., El-Mohamady, H. I., Harrison, R. A., und Mansour, M. M. (1998) *Schistosoma mansoni*: the circulating cathodic antigen forms an abundant product of 41/42 kDa in the urine of infected patients. *Exp. Parasitol.* **90**, 286-289
7. Attallah, A. M., Ismail, H., El Masry, S. A., Rizk, H., Handousa, A., El Bendary, M., Tabll, A., und Ezzat, F. (1999) Rapid detection of a *Schistosoma mansoni* circulating antigen excreted in urine of infected individuals by using a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 354-357
8. Gryseels, B., Stelma, F., Talla, I., Polman, K., van Dam, G., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R. F., Decam, C., Niang, M., und Deelder, A. M. (1995) Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**, 271-276
9. van Dam, G. J., Bogitsh, B. J., van Zeyl, R. J., Rotmans, J. P., und Deelder, A. M. (1996) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* and *in vivo* excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J. Parasitol.* **82**, 557-564
10. Ndhlovu, P., Cadman, H., Gundersen, S. G., Vennervald, B., Friis, H., Christensen, N., Mutasa, G., Haagensen, I., Chandiwana, S. K., und Deelder, A. M. (1995) Optimization of the magnetic bead antigen capture enzyme immuno assay for the detection of circulating anodic antigens in mixed *Schistosoma* infections. *Acta Trop.* **59**, 223-235
11. Nourel Din, M. S. A., Kornelis, D., van Zeyl, R. J. M., und Deelder, A. M. (1994) Immunologic characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 487-498
12. Butterworth, A. E. (1993) in *Human Schistosomiasis* (Jordan, P., Webbe, G., und Sturrock, R. F., eds), Immunology of schistosomiasis. pp. 331-366, CAB International, Wallingford

13. Fouad Ahmed, S., Oswald, I. P., Caspar, P., Hieny, S., Keefer, L., Sher, A., und James, S. L. (1996) Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **65**, 219-226
14. Cioli, D., Liberti, P., und Festucci, A. (1987) Stage-specific schistosome antigens. *Acta Trop.* **44**, Suppl. 12, 70-74
15. Ko, A. I., Dräger, U. C., und Harn, D. A. (1990) A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4159-4163
16. Damian, R. T. (1987) Immunological aspects of host-schistosome relationships. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82**, Suppl. 4, 13-16
17. Damian, R. T. (1989) Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **145**, 101-115
18. Umeda, M., Diego, I., und Marcus, D. M. (1986) The occurrence of anti-3-fucosyllactosamine antibodies and their cross-reactive idiotopes in preimmune and immune mouse sera. *J. Immunol.* **137**, 3264-9
19. Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Lochnit, G., und Geyer, R. (2000) *Schistosoma mansoni* cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. *Glycobiology* **10**, 89-101
20. Wuhrer, M. (1999) Charakterisierung stadienspezifisch exprimierter Glykolipide des Humanparasiten *Schistosoma mansoni*. in *Dissertation im Biochemischen Institut am Klinikum*, pp. 0-170, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen
21. Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Lochnit, G., und Geyer, R. (1999) Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **103**, 155-169
22. Weiss, J. B., Magnani, J. L., und Strand, M. (1986) Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *J. Immunol.* **136**, 4275-4282
23. Weiss, J. B., und Strand, M. (1985) Characterization of developmentally regulated epitopes of *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein antigens. *J. Immunol.* **135**, 1421-1429
24. Richter, D., Incani, R. N., und Harn, D. A. (1996) Lacto-N-fucopentaose III (Lewis^x), a target of the antibody response in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **64**, 1826-1831
25. Nyame, A. K., Pilcher, J. B., Tsang, V. C. W., und Cummings, R. D. (1996) *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le^x determinants on myeloid cells. *Exp. Parasitol.* **82**, 191-200
26. Köster, B., und Strand, M. (1994) *Schistosoma mansoni*: immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology* **108**, 433-446
27. Dissous, C., Grzych, J. M., und Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* **323**, 443-5
28. Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B. B., und Solter, D. (1983) Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Res.* **43**, 669-78

29. van Dam, G. J., Claas, F. H., Yazdanbakhsh, M., Kruize, Y. C., van Keulen, A. C., Ferreira, S. T., Rotmans, J. P., and Deelder, A. M. (1996) *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood* **88**, 4246-51
30. Skubitz, K. M., and Snook, R. W. D. (1987) Monoclonal antibodies that recognize lacto-*N*-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-1/HMac-1/gp 150,95) and CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.* **139**, 1631-9
31. Omer-Ali, P., Smithers, S. R., Bickle, Q., Phillips, S. M., Harn, D., and Simpson, A. J. G. (1988) Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. *J. Immunol.* **140**, 3273-9
32. Harn, D. A., Mitsuyama, M., and David, J. R. (1984) *Schistosoma mansoni* anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge *in vivo*. *J. Exp. Med.* **159**, 1371-1387
33. Grzych, J. M., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P. H., and Capron, A. (1987) *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* **165**, 865-78
34. James, S. L., and Sher, A. (1990) Cell-mediated immune response to Schistosomiasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **155**, 21-31
35. Velupillai, P., and Harn, D. A. (1993) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 18-22
36. Palanivel, V., Posey, C., Horauf, A. M., Solbach, W., Piessens, W. F., and Harn, D. A. (1996) B-cell outgrowth and ligand-specific production of IL-10 correlate with Th2 dominance in certain parasitic diseases. *Exp. Parasitol.* **84**, 168-177
37. Lejoly-Boisseau, H., Appriou, M., Seigneur, M., Pruvost, A., Tribouley-Duret, J., and Tribouley, J. (1999) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* adhesion of parasite eggs to the vascular endothelium. Subsequent inhibition by a monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope. *Exp. Parasitol.* **91**, 20-29
38. Romeis, B. (1989) *Mikroskopische Technik* Romeis, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore
39. Kniep, B., and Mühlradt, P. F. (1990) Immunochemical detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **188**, 5-8
40. Kniep, B., and Ebel, F. (1993) Lipids and glycolipids. in *Methods of Immunological Analysis* (Masseyeff, R. F., Albert, W. H., and Staines, N. A., eds) Vol. 2, pp. 90-105, VCH, Weinheim
41. Conyers, S. M., and Kidwell, D. A. (1991) Chromogenic substrates for horseradish peroxidase. *Anal. Biochem.* **192**, 207-211
42. Dai, Y., Whittall, R. M., Brudges, C. A., Isogai, Y., Hindsgaul, O., and Li, L. (1997) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the analysis of monosulfated oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **304**, 1-9
43. Glocker, M. O., Bauer, S. H. J., Kast, J., Volz, J., and Przybylski, M. (1996) Characterization of specific noncovalent protein complexes by

- UV matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1221-1227
44. Pfenninger, A., Karas, M., Finke, B., Stahl, B., und Sawatzki, G. (1999) Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk. *J. Mass Spectrom.* **34**, 98-104
 45. Gustafsson, M. K. (1987) Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the nervous system of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **74**, 168-174
 46. Brownlee, D. J. A., I Fairweather, C.F. Johnson, M.C. Thorndyke, P.J. Skuce. (1995) Immunocytochemical demonstration of a SALMFamide-like neuropeptide in the nervous system of adult and larval stage of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **110**, 143-153
 47. Khoo, K. H., Chatterjee, D., Caulfield, J. P., Morris, H. R., und Dell, A. (1997) Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology* **7**, 663-77
 48. Khoo, K. H., Huang, H. H., und Lee, K. M. (2001) Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* **11**, 149-63.
 49. van Remoortere, A., Hokke, C. H., van Dam, G. J., van Die, I., Deelder, A. M., und van den Eijnden, D. H. (2000) Various stages of *Schistosoma* express Lewis(x), LacdiNAc, GalNAc β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc and GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology* **10**, 601-9
 50. Kantelhardt, S. R., Wuhler, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M., Bickle, Q., und Geyer, R. (2002) Fuc(α 1-3)GalNAc-: a major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole limpet hemocyanin crossreactivity. *Biochem. J.* **366**, 217-23
 51. Thors, C., und Linder, E. (1998) Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **20**, 489-96
 52. Geyer, H., Schmitt, S., Wuhler, M., und Geyer, R. (1999) Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.* **71**, 476-482
 53. Bogers, J. J., Nibbeling, H. A., van Marck, E. A., und Deelder, A. M. (1994) Immunofluorescent visualization of the excretory and gut system of *Schistosoma mansoni* by confocal laser scanning microscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 612-9
 54. Wuhler, M., Kantelhardt, S. R., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Lochnit, G., und Geyer, R. (2002) Characterization of glycosphingolipids from *Schistosoma mansoni* eggs carrying Fuc(α 1-3)GalNAc-, GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- and Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- (Lewis X) terminal structures. *Eur. J. Biochem.* **269**, 481-93
 55. van Dam, G. J., Kornelis, D., Zeyl, R. J. M. v., und Deelder, A. M. (1993) *Schistosoma mansoni*: analysis of monoclonal antibodies reactive with gut-associated antigens. *Parasitol. Res.* **79**, 55-62
 56. Srivatsan, J., Smith, D. F., und Cummings, R. D. (1992) The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 20196-20203

57. Ben-Ismail, R., Carne, B., Mogahed, A., Niel, G., und Gentilini, M. (1982) Antigen sharing between *Fasciola hepatica* and human erythrocytes. *Tropenmed. Parasitol.* **33**, 11-4
58. Ben-Ismail, R., Mulet-Clamagirand, C., Carne, B., und Gentilini, M. (1982) Biosynthesis of A, H, and Lewis blood group determinants in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* **68**, 402-7
59. McKibbin, J. M., Spencer, W. A., Smith, E. L., Mansson, J. E., Karlsson, K. A., Samuelsson, B. E., Li, Y. T., und Li, S. C. (1982) Lewis blood group fucolipids and their isomers from human and canine intestine. *J. Biol. Chem.* **257**, 755-60
60. Hakomori, S., und Andrews, H. D. (1970) Sphingoglycolipids with Leb activity, and the co-presence of Le^a-, Le^b-glycolipids in human tumor tissue. *Biochem. Biophys. Acta* **202**, 225-8
61. Yang, H. J., und Hakomori, S. I. (1971) A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-N-fucopentaose 3. *J. Biol. Chem.* **246**, 1192-200
62. Hakomori, S. I. (1966) Release of carbohydrates from sphingoglycolipid by osmium-catalyzed periodate oxidation followed by treatment with mild alkali. *J. Lipid Res.* **7**, 789-92
63. Hakomori, S. I., Koscielak, J., Bloch, K. J., und Jeanloz, R. W. (1967) Immunologic relationship between blood group substances and a fucose-containing glycolipid of human adenocarcinoma. *J. Immunol.* **98**, 31-8
64. Nyame, A. K., Debose-Boyd, R., Long, T. D., Tsang, V. C., und Cummings, R. D. (1998) Expression of Le^x antigen in *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* and immune responses to Le^x in infected animals: lack of Le^x expression in other trematodes and nematodes. *Glycobiology* **8**, 615-24

Herzlichen Dank an...

- ... Prof. Dr. Rudolf Geyer für die interessante Themenstellung und die außerordentlich gute und nette Betreuung
- ... PD Dr. Roger Dennis für sein großes Interesse und seine stets interessante Diskussionsbereitschaft
- ... Dr. Manfred Wuhrer für seine unermüdliche Hilfe bei den praktischen Versuchen, seine nahezu nie enden wollenden Ideen und seine Geduld beim Diskutieren und Interpretieren der gewonnenen Ergebnisse
- ... Dr. Quentin Bickle, Dr. David Dunne und Dr. Michael Doenhoff für die Bereitstellung der verschiedenen Antikörper, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre
- ... die Arbeitsgruppe von Prof. Ewald Beck für die Bereitstellung des Parasitenmaterials
- ... meine liebe Freundin Diana Fischer für die liebevolle Betreuung zu Hause und die ständige Motivation
- ... alle Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Geyer für die stete Hilfsbereitschaft, das große Interesse an der Arbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima
- ... Dr. Manfred Wuhrer und PD Dr. Roger Dennis für das Korrekturlesen dieser Arbeit
- ... meine gesamte Familie und Freunde für die Begleitung und Betreuung während der Promotion und des Studiums

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Bausch
Vorname:	Tobias
Geburtsdatum/-ort:	16.06.1973 in München
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch

Schulbildung:

1979-1982:	Grundschule, Bad Soden Salmünster
1982-1989:	Gymnasium, Schlüchtern
1989-1992:	Gymnasium, Gelnhausen
	Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1994-2000:	Justus-Liebig-Universität, Gießen: Humanmedizin
1996:	ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1997:	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1999:	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2000:	dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufsausbildung:

1992:	Ausbildung zum Rettungssanitäter
-------	----------------------------------

Berufserfahrungen:

1992-1994:	Rettungssanitäter beim DRK (Gelnhausen)
praktisches Jahr:	Pädiatrie, Chirurgie, Innere Medizin im Kreiskrankenhaus in Bad Hersfeld
Arzt im Praktikum:	seit dem 01.01.2001 im Krankenhaus München-Schwabing, Klinik für Kinderheilkunde

Promotionsarbeit:

1996-1999:	praktischer Teil der Promotionsarbeit, Biochemisches Institut des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen, Arbeitsgruppe Glycokonjugate von Prof. Dr. R. Geyer
------------	---